



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Determinação da prevalência da infeção por *Leishmania infantum* em gatos
errantes da região de Faro

Cláudia Sofia Brás Cruz

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

OUTUBRO, 2017



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Determinação da prevalência da infeção por *Leishmania infantum* em gatos errantes da região de Faro

Autor: Cláudia Sofia Brás Cruz

Orientador: Investigadora Doutora Carla Maia

Coorientador: Professora Doutora Lenea Campino

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, realizada no Grupo de Leishmanioses da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, sob a orientação científica da Doutora Carla Maia e da Professora Doutora Lenea Campino pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Os resultados incluídos na presente Dissertação, foram parcialmente apresentados no XIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro, que teve lugar em Santa Maria da Feira, Portugal, dias 18 e 19 de Fevereiro de 2017.

“Maia C, **Cruz C**, Cristóvão J, Cachola P, Brancal H, Martins A, Pereira A, Campino L. “*Leishmania* infection in cats from three canine leishmaniasis endemic foci from Portugal”.

Dedicatória

Ao meu querido avô...

Esteja ele onde estiver, sempre me apoiou e olhou por mim!

Agradecimentos

Quero agradecer à minha orientadora Investigadora Doutora Carla Maia por toda a disponibilidade e ajuda para o que fosse necessário, bem como a partilha de conhecimento para conseguir concluir a tese e também absorver toda a aprendizagem adquirida nestes dois anos. Com esta etapa e com a ajuda da Professora Carla, sinto que evolui a nível profissional e a nível pessoal, conseguindo superar as minhas dificuldades e chegar aos meus objetivos finais.

À minha coorientadora, Professora Doutora Lenea Campino pois sempre que foi necessário, esteve disponível para me ajudar.

Ao Mestre José Manuel Cristóvão que foi o “meu braço direito” no laboratório, que me acompanhou sempre que foi necessário e sempre mostrou um conhecimento e dedicação contagiante, ao ponto de nunca me sentir com vontade de desistir, mas sim continuar a trabalhar para alcançar o que sempre desejei.

Ao Mestre André Pereira que foi fundamental na estruturação de gráficos, tabelas e claro na transmissão de conhecimentos. Ele é um exemplo a seguir!

Com a ajuda de todos consegui alcançar mais um objetivo na minha vida e carreira académica. Levo comigo uma bagagem enorme de conhecimento, amizade, camaradagem, espírito de grupo e orgulho por ter pertencido a este grupo formidável.

Às minhas amigas, por me aturarem os desabafos, foram muito importantes nestes anos.

Por fim, à minha família, pais, avós e ao Fábio, pois sem eles nada disto era possível, devido ao apoio incondicional dado e à compreensão pela minha dedicação a esta etapa.

Muito obrigado!!

Resumo

A leishmaniose causada pelo parasita *Leishmania infantum* é uma doença zoonótica com uma importância grande para a população humana e animal devido à elevada morbidade e mortalidade em regiões endémicas. Apesar do cão ser o principal hospedeiro e reservatório do parasita, o papel do gato doméstico na epidemiologia da doença tem vindo a adquirir um interesse crescente.

A presente dissertação baseia-se num rastreio epidemiológico da infeção por *Leishmania infantum* em gatos errantes do distrito de Faro. A amostra total foi de 75 gatos. Foram utilizados cinco métodos de diagnóstico, três serológicos (IFI, CIE e ELISA) e dois moleculares (PCR e “Nested”-PCR). Tendo em conta que foram considerados como expostos ou infetados pelo parasita os animais cujas amostras se revelaram positivas para pelo menos uma das técnicas utilizadas no estudo, a prevalência da infeção por *Leishmania* foi de 29,3% (22/75).

Os resultados obtidos reforçam a necessidade de alertar os proprietários e os médicos veterinários para o risco de infeção da população felina por este parasita, e a necessidade de implementação de medidas profiláticas para proteger animais e pessoas.

Palavras-chave: gato; *Leishmania spp.*; zoonose; Faro,

Abstract

Leishmaniasis caused by the parasite *Leishmania infantum* is a zoonotic disease of great importance to the human and animal population due to its high morbidity and mortality in endemic regions. Although the dog is the main host and reservoir of the parasite, the role of domestic cat in the epidemiology of the disease has been argued.

The present dissertation is based on an epidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the Faro district. The total sample consisted of 75 cats. Five diagnostic methods, three serological (IFAT, CIE and ELISA) and two molecular (PCR and “Nested”-PCR) were used. As the animals whose samples were positive for at least one of the techniques used in the study were considered as exposed to or infected by the parasite, the prevalence of *Leishmania* infection obtained in this study was 29.3% (22/75).

This study reinforces the need of both owners and veterinarians to be aware of the risk of infection by this parasite in the feline population, and to the need to implement prophylactic measures to protect animals and people.

Keywords: cat; *Leishmania spp.*; zoonosis; Faro.

Índice Geral

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice Geral	xi
Índice de figuras.....	xiv
Lista de abreviaturas	xvi
Lista de símbolos.....	i
I. Introdução	1
1. Parasita	2
1.1 Taxonomia	2
1.2 Morfologia do parasita	4
2. Hospedeiros	5
2.1 Hospedeiro Invertebrado (vetor)	5
2.1.1 Características morfológicas	5
2.2 Hospedeiro Vertebrado	7
3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	9
4. Leishmaniose felina (LFe).....	12
5. Interação Parasita-Hospedeiro.....	16
6. Epidemiologia das Leishmanioses.....	18
7. Leishmaniose em Portugal.....	19
8. Métodos de Diagnóstico laboratorial	21
8.1 Diagnóstico parasitológico.....	22
8.1.1 Exame direto e cultural.....	22
8.2 Diagnóstico molecular.....	23
8.3 Diagnóstico Serológico	24
8.3.1 Imunofluorescência indireta (IFI)	25
8.3.2 Contraimuno-electroforese (CIE)	25
8.3.3 Teste de aglutinação direta (DAT)	26

8.3.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	26
9. Tratamento.....	27
10. Medidas de Controlo	28
II. Objetivos.....	30
1. Material e Métodos	31
1.2 Área de estudo	31
1.3 Colheita das amostras biológicas	32
1.4 Recolha de sangue periférico e de pele	33
1.5 Extração de DNA de sangue periférico e de pele.....	33
2. Diagnóstico serológico para deteção de anticorpos anti-<i>Leishmania</i>. 35	35
2.1 Teste de imunofluorescência Indireta (IFI).....	35
2.2 Teste de contraimuno-electroforese (CIE)	36
2.3 ELISA.....	37
3. Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i>	38
3.1 PCR	38
3.2 “Nested”-PCR	39
4. Análise de dados	41
5. Resultados	42
5.1 Caracterização da amostra	42
5.2 Deteção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> por técnicas serológicas	43
5.3 Deteção de DNA de <i>Leishmania</i>	43
6. Discussão	48
7. Conclusão	54
Referências bibliográficas	55
ANEXOS.....	72

Índice de figuras

Fig. 1: Classificação atualizada das espécies de <i>Leishmania</i> . (Imagem do autor, adaptado de Akhoundi <i>et al.</i> 2017)	3
Fig. 2 Flebótomo fêmea. (Adaptado de Hailu <i>et al.</i> 2005).....	5
Fig. 3 Morfologia de flebotomos (Phlebotominae).	6
Fig. 4 Áreas de Leishmaniose Canina. Adaptado de Bourdeau (EMOP 2004; ECVD 2009) http://www.frontline.pt/Insectosvoadores/Pages/Flebotomos.aspx	9
Fig. 5 Ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i> (Adaptado de Gossage <i>et al.</i> 2003)...10	
Fig. 6 Detecção da infeção por <i>Leishmania infantum</i> em gatos em países endémicos de leishmaniose (imagem do autor, adaptado de Pennisi <i>et al.</i> 2015)	13
Fig. 7 Conjuntivite nodular (pálpebra superior) e dermatite ulcerativa em membro anterior (Pennisi <i>et al.</i> 2015)	15
Fig. 8 Mapa de Portugal. Evidenciando a zona de estudo, Faro. (Adaptado de Maia <i>et al.</i> 2013)	32
Fig. 9 Preparação das amostras a serem testadas através da técnica serológica de IFI (foto do autor).....	36
Fig. 10 Caracterização da amostra segundo o género (n=75).	42
Fig. 11 Técnica de contraimuno-electroforese. Formação de um arco de precipitação, correspondente à amostra AL26 (foto do autor).	43
Fig. 12 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os resultados da amplificação de DNA de <i>L. infantum</i> com os “primers” MC1 e MC2: Marcador 100pb; CN: controlo negativo; CP: controlo positivo.	44
Fig. 13 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os resultados da amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp. através da técnica de “Nested” -PCR: Marcador 100pb; Linhas 1, 6, 8, 9, 10 amostras positivas. CN2: controlo negativo da 2ª reação; CN1: controlo negativo da 1ª reação; CP: controlo positivo.	44

Lista de abreviaturas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Adenosina trifosfato

BetFel – β -actina felina

DAT – Técnica de aglutinação directa

ELISA – Ensaio imunoenzimático (do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”)

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

g – grama

g – Unidade de força G

IFI – Imunofluorescência indirecta

IFN- γ – Interferão gama

IgG – Imunoglobulinas G

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IL-2 – Interleucina 2

kDNA – DNA cinetoplastideal

Kg – Quilograma

LCan – Leishmaniose canina

LFel – Leishmaniose felina

LVZ- Leishmaniose visceral zoonótica

m – Minutos

mA – Miliampere

mg – Miligrama

Mg²⁺ - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

Nm – Nanómetro

N-PCR – “Nested”-PCR

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)

pmol – Picomole

qPCR – PCR em tempo real (do inglês “real-time PCR”)

ARN – Ácido ribonucleico

rz – Razão

s – Segundo

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

X – unidade de número de diluições

μ g – Micrograma

μ l – Microlitro

μ m – Micrómetro

Lista de símbolos

β - Beta

α - Alfa

γ – Gamma

°C - Graus Celsius

% - Percentagem

® – Marca Registada

I. Introdução

As doenças provocadas por protozoários são conhecidas como importantes causas de morbidade e mortalidade humanas nas regiões tropicais, e a descoberta da sua etiologia e mecanismos de transmissão constituem contribuições clássicas para a história da medicina humana (Duguid *et al.* 1982). As leishmanioses são endêmicas em 98 países estando presentes em todos os continentes, com exceção da Antártida (Organização Mundial de Saúde [OMS, 2014]) e estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (Halimi *et al.* 2016).

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por um protozoário intracelular do género *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), e estão entre as doenças parasitárias transmitidas por vetores emergentes e re-emergentes mais importantes, ficando apenas atrás da malária em termos de número de pessoas afetadas (Halimi *et al.* 2016). Os vetores são artrópodes do género *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) (Gramiccia, 2011). Em humanos existem três formas clínicas da doença: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (Sundar & Rai, 2002).

O cão é considerado o principal reservatório doméstico/ peridoméstico da LV zoonótica (LVZ). A leishmaniose canina (LCan) causada por *Leishmania infantum* é endêmica em 50 países afetando duas grandes regiões, a América do Sul e a região do Mediterrâneo. A prevalência nessas regiões é variável, em grande parte influenciada por condições climáticas e ecológicas, que determinam a abundância do vetor.

1. Parasita

1.1 Taxonomia

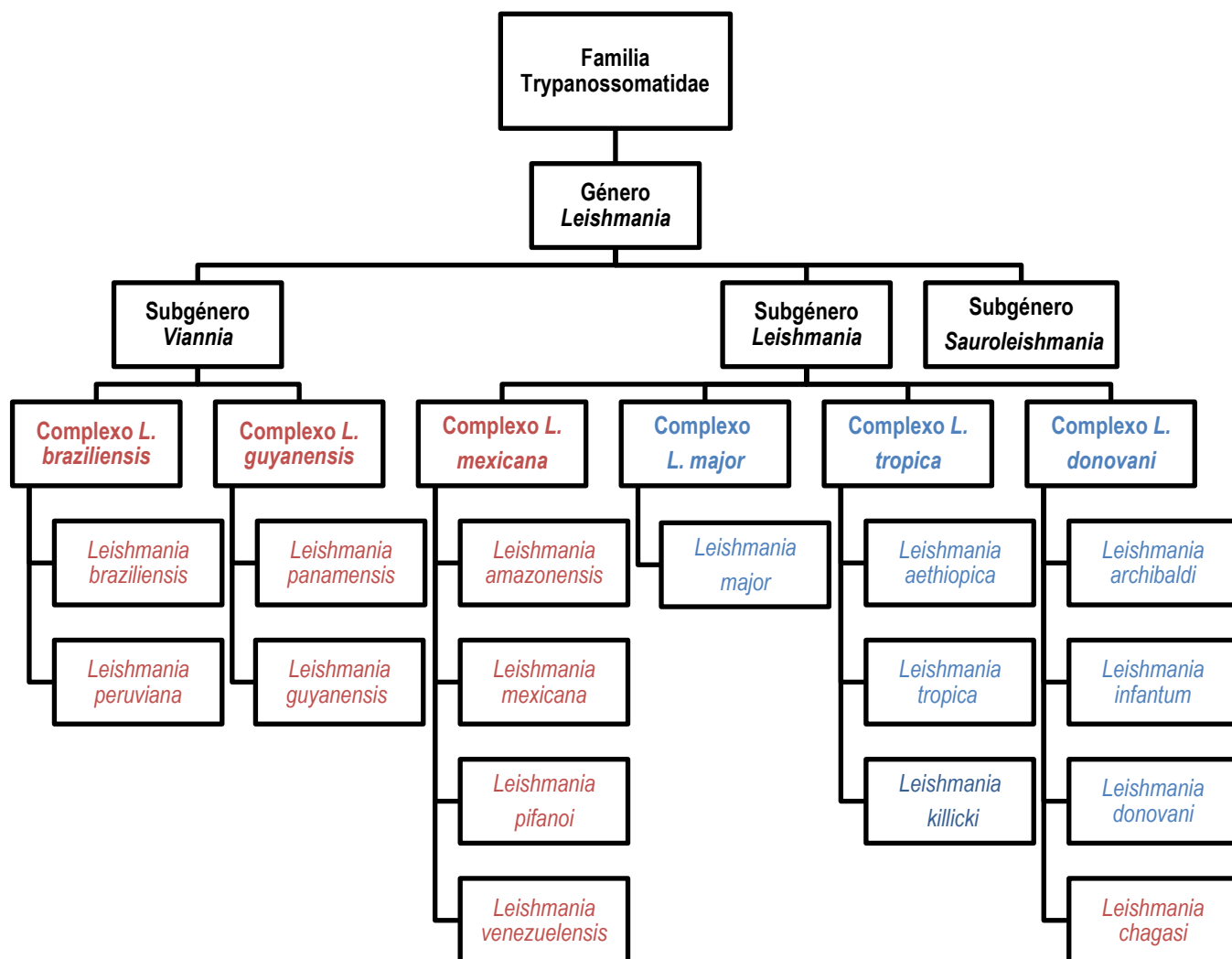
Entre as 53 espécies de *Leishmania* conhecidas atualmente, 21 espécies são patogênicas para o ser humano, provocando manifestações clínicas viscerais, cutâneas e mucocutâneas (Akhoundi *et al.* 2017).

O género *Leishmania*, é composto pelos subgéneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* e pelo complexo *L. enriettii* (Figura 1). Dentro do subgénero *Leishmania* individualizam-se quatro complexos filogenéticos, que incluem uma ou mais espécies: *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. tropica* (Akhoundi *et al.* 2017).

A espécie mais importante associada aos animais é *L. infantum* no Velho Mundo, sinónimo de *L. chagasi* no Novo Mundo (Solano-Gallego *et al.* 2009). No ciclo antroponótico, as principais espécies são *L. tropica* e *L. donovani* (Ready, 2010).

As espécies encontradas nos gatos domésticos até hoje foram: *L. infantum* (Europa e Irão), *L. chagasi* (Brasil), *L. venezuelensis* (Venezuela), *L. mexicana* (Estados Unidos da América), *L. (V.) braziliensis* (Brasil e Guiana Francesa) e *L. amazonensis* (Brasil), sendo as 3 últimas espécies responsáveis, sobretudo, por sinais dermatológicos (Pennisi *et al.* 2013).

Fig. 1: Classificação atualizada das espécies de *Leishmania*. (Imagem do autor, adaptado de Akhouni *et al.* 2017).



Legenda: As espécies do Velho e Novo Mundo estão representadas a azul e a vermelho, respetivamente.

1.2 Morfologia do parasita

Os parasitas do género *Leishmania* possuem uma grande homogeneidade estrutural, impedindo que as espécies fossem identificadas por características morfológicas, razão pela qual a sua identificação e classificação era efetuada com base em critérios extrínsecos aos mesmos, tais como a sua patogénese, o tipo de hospedeiro e distribuição geográfica. Atualmente os fatores intrínsecos do parasita são cada vez mais estudados, sendo a tipagem isoenzimática, fundamentada pela mobilidade electroforética das isoenzimas dos diferentes parasitas, a técnica de referência para a identificação das espécies de *Leishmania* (Dedet & Pratlong, 2011). Nos países do Mediterrâneo, *L. infantum* zimodemo MON-1 é o principal agente etiológico de LCan e LVZ (Cardoso & Solano-Gallego, 2013).

Os protozoários *Leishmania* apresentam duas formas distintas: forma amastigota e forma promastigota.

A forma amastigota arredondada ou oval com cerca de 2 a 6 µm de diâmetro, localiza-se no interior das células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado. O citoplasma apresenta um núcleo arredondado, excêntrico e bem visível e um cinetoplasto (estrutura que contém uma quantidade importante de DNA (kDNA) e prolonga a única mitocôndria celular); e um envelope flagelar (blefaroplasto) que contém um flagelo rudimentar.

A forma promastigota é extracelular fusiforme com cerca de 13-15 X 3 µm e encontra-se no trato digestivo dos flebótomos (vetor invertebrado). Esta forma possui um longo flagelo responsável pela motilidade e o cinetoplasto situa-se entre o núcleo e o flagelo (Rodríguez, 2012).

2. Hospedeiros

2.1 Hospedeiro invertebrado (vetor)

Os vetores responsáveis pela transmissão do parasita são insetos dípteros, da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Killick-Kendrick *et al.* 1991). Os flebótomos têm um grande significado médico e veterinário, capazes de transmitir agentes patogénicos tais como arbovírus (dos géneros *Phlebovirus*, *Orbivirus* e *Vesiculovirus*), bactérias (do género *Bartonella*) e protozoários. Cerca de 98 espécies flebotomínicas são potencial ou comprovadamente vetoras de *Leishmania* (Maroli *et al.* 2013).

As espécies de flebótomos responsáveis pela leishmaniose no Velho Mundo pertencem ao género *Phlebotomus* enquanto no Novo Mundo pertencem ao género *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, 1999; Afonso & Alves-Pires, 2008; OMS, 2010).

2.1.1 Características morfológicas

Os flebótomos são insetos, caracterizados por possuírem cor acastanhada clara ou escura, asas estreitas e eretas, corpo delgado e patas compridas. O aparelho bucal é do tipo picador-sugador, formado por seis peças: lábio, epifaringe, um par de mandíbulas e um par de maxilas (Branco, 2011). São insetos muito pequenos (comprimento varia entre 2 e 3 mm) e muito frágeis (Dhiman *et al.* 2016). Apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen (Figura 2). A forma do abdómen permite distinguir o sexo do flebótomo, uma vez que apenas os machos possuem os últimos segmentos posteriores modificados, apresentando-se em forma de garra e designando-se por genitália (Figura 3) (Afonso & Alves-Pires, 2008). Por sua vez, as fêmeas têm os últimos segmentos “normais”, não apresentando a garra, como nos machos.



Fig. 2 Flebótomo fêmea. (Adaptado de Hailu *et al.* 2005).

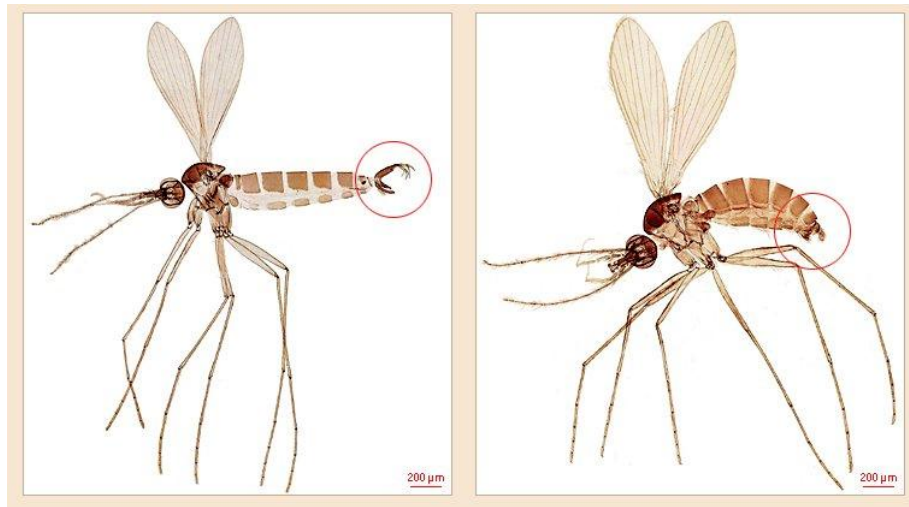


Fig. 3 Morfologia de flebotomos (Phlebotominae). Da esquerda para a direita: macho e fêmea.

<http://web.bioucm.es/cont/ea/sesiones.php?sesion=103&bloque=3>

2.1.2 Ciclo de vida e bioecologia

O ciclo de vida destes pequenos insetos é de cerca de 45 dias, variando com a temperatura, humidade e fotoperíodo. São holometabólicos, isto é, apresentam metamorfoses completas, incluindo quatro fases distintas de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e imago ou adulto (Afonso & Alves-Pires, 2008; Branco, 2011). O ovo tem uma forma elipsoidal, ligeiramente encurvada, e varia de 0,3 a 0,5 mm de comprimento. As larvas são vermiformes e atingem cerca de 8 mm de comprimento. Os flebotomos procriam em sítios terrestres e com matéria orgânica para as larvas se alimentarem, tais como tocas de animais e abrigos, edifícios abandonados, cavernas e paredes de pedra (Risueño *et al.* 2017).

Quer os machos, quer as fêmeas, são fitófagos, ou seja, alimentam-se de sucos vegetais ou açúcares provenientes de plantas ou de outros insetos para obterem a energia necessária à sua sobrevivência, mas as fêmeas alimentam-se de sangue de vertebrados, que é fundamental para suprir as carências necessárias para a ovogénese. A atividade dos flebotomos adultos é crepuscular ou mesmo noturna, variando com a

época do ano estando descrita para Portugal entre Maio a Outubro (Afonso & Alves-Pires, 2008).

As condições ambientais para o seu ciclo de vida são muito estritas e variáveis, dependendo das espécies, das condições climáticas (temperaturas médias entre os 15°C e os 20°C), fotoperíodo e disponibilidade de alimento (Afonso & Alves-Pires, 2008). Quando adultos, durante o dia permanecem em lugares abrigados da luz solar direta, apresentando uma atividade crepuscular e noturna. Os locais de repouso que os flebótomos procuram, são normalmente locais mais frescos e húmidos (Killick-Kendrick, 1999). Temperaturas elevadas prolongam a atividade do vetor e diminuem o período de diapausa, aumentando assim o número de gerações anuais. Estes fatores podem acelerar a maturação do parasita levando a um possível aumento do risco de infeção (McCarthy *et al.* 2001).

No que diz respeito às leishmanioses, estes insetos são os agentes focalizadores da doença uma vez que a existência de focos zoonóticos, ou antroponóticos está limitada à presença de espécies vetoras, à sua abundância, à existência de hospedeiros vertebrados infetados e às condições climáticas e ambientais em geral (Afonso & Alves-Pires, 2008).

2.2 Hospedeiro vertebrado

A ecologia de *Leishmania* spp. está associada aos hospedeiros em que se encontra, de modo que todos os fatores que afetem a sua sobrevivência e o seu comportamento podem interferir no ciclo de transmissão do parasita. Um hospedeiro vertebrado pode ser classificado como reservatório se for a fonte da infeção humana e se permitir que o parasita se multiplique indefinidamente (Ashford & Bettini, 1987), pelo que, para cada espécie de *Leishmania* pode existir um ou um número reduzido de reservatórios. Estas infeções são maioritariamente zoonoses, tendo como hospedeiros principais mamíferos silváticos ou domésticos. Este parasita pode afetar animais de pecuária (equinos, bovinos, suínos e caprinos) e animais silváticos (raposas, saca rabos, lobos, lince ibérico e texugos) (Ramos, 2012). Como em qualquer outro sistema

parasita-hospedeiro, a infecção por *Leishmania* é determinada por vários fatores do hospedeiro como, a espécie, sexo, idade e genética (Roque *et al.* 2014).

Considera-se um “bom” reservatório quando a infecção que provoca seja de caráter crónico, isto é, que suporte a presença do parasita por um longo período de tempo antes da morte ou da cura. O cão é considerado um bom reservatório de *L. infantum* uma vez que se verifica haver sobreposição do habitat do homem e do cão e frequente contacto com flebótomos zoo-antropofílicos (Santos-Gomes *et al.* 2000). Outras espécies de *Leishmania* já identificadas no cão são: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis* (Tomás & Romão, 2008; Solano-Gallego, 2009, Gramiccia, 2011), *L. tropica*, *L. donovani* (Gramiccia, 2011) e *L. amazonensis* (Gramiccia, 2011). A LCan causada pela espécie *L. infantum*, é endémica na bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente e na América do Sul (Figura 4) sendo o cão o principal hospedeiro e o reservatório doméstico/peridoméstico da leishmaniose visceral humana. No sudoeste da Europa, estima-se que pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infetados, e estudos recentes reportam a expansão desta parasitose para o norte do continente Europeu (Maia e Cardoso, 2015). A LCan é uma doença crónica e progressiva, caracterizada pela disseminação do parasita através de vários órgãos. O período de incubação é longo, podendo variar de meses a anos. Tendo uma evolução crónica, a doença pode persistir mais do que uma época de transmissão. A LCan exibe uma ampla gama de sinais clínicos como linfadenomegalia, perda de peso, mucosas pálidas, esplenomegalia e alopecia, podendo outros sinais, isolados ou combinados, como poliúria / polidipsia, diarreia, febre, sinais oculares ou artropatia estar presentes (Daval *et al.* 2016; Hosein *et al.* 2017). A principal causa de morte atribuída à LCan é devido a danos severos nos rins, nomeadamente a responsável por causar glomerulonefrite. No entanto, a maioria dos cães permanece assintomática apesar de estarem infetados (Daval *et al.* 2016). As formas amastigotas de *Leishmania* são encontradas principalmente nos órgãos do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, gânglios linfáticos, fígado e medula óssea (Alvar *et al.* 2004). A interação entre ambos levam a resultados diferentes, desde a total ausência de doença a situações patológicas muito graves (Hernandez, 2012). Os dois extremos opostos deste espectro clínico são caracterizados por: imunidade protetora que é mediada por células T CD4+, pela libertação de interferão- γ (interferão gama), IL-2 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) que induzem a atividade

microbicida dos macrófagos; e suscetibilidade à doença que está associada à produção de uma resposta imune humoral não protetora e uma imunidade celular reduzida ou deprimida com uma resposta mista de citocinas Th1 e Th2.

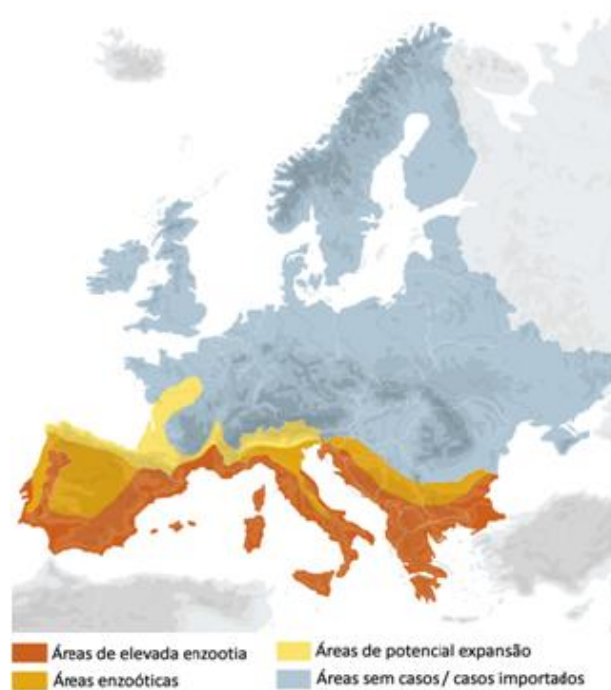


Fig. 4 Áreas endémicas de Leishmaniose Canina na Europa. Adaptado de Bourdeau (EMOP 2004; ECVD 2009)
<http://www.frontline.pt/Insectosvoadores/Pages/Flebotomos.aspx>

3. Ciclo de vida de *Leishmania*

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Figura 5) no hospedeiro invertebrado é de cerca de 6 a 10 dias após a refeição sanguínea da fêmea vetora, dependendo da espécie e também das condições ambientais (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Como referido anteriormente, a forma promastigota encontra-se no sistema digestivo do flebótomo, cumprindo o seu ciclo extracelular no lúmen intestinal. O parasita consegue sobreviver às condições hidrolíticas do intestino do flebótomo graças aos constituintes glucoconjugados estruturais que se expressam em toda a superfície do

parasita, tendo como função resistir a todo o processo de digestão do flebótomo e conseguir aderência nas paredes do intestino para o parasita não ser eliminado (Rodríguez, 2012).

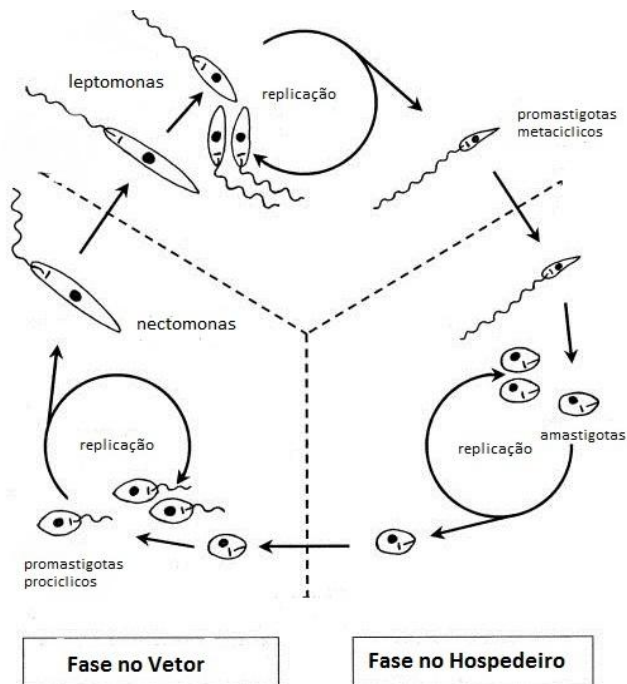


Fig. 5 Ciclo de vida das espécies de *Leishmania* (Adaptado de Gossage *et al.* 2003).

A forma infetante para o hospedeiro definitivo são os promastigotas metacíclicos; estas formas são extremamente ativas e possuem um flagelo maior do que o comprimento do corpo (Rodríguez, 2012). Estas formas são inoculadas no hospedeiro definitivo pela picada do flebótomo fêmea, sendo rapidamente fagocitadas pelos macrófagos, onde se dá a transformação para amastigotas (Hernandez, 2012; Bates, 2007). A forma amastigota tem a capacidade, através de mecanismos intrínsecos, de resistir à ação das enzimas hidrolíticas lisossomais e aos radicais livres de oxigênio. Assim, conseguem evitar os mecanismos microbicidas, dependentes do oxigênio e os do óxido nítrico que ocorrem com a ativação dos macrófagos. Estas formas parasitárias estão presentes nos fagolisossomas de macrófagos e outros fagócitos, o que significa que para ter acesso aos parasitas os flebótomos têm de inserir as suas peças bucais na

pele e provocar uma pequena ferida no qual o sangue flui dos capilares superficiais ingerindo assim o sangue infetado (Bates, 2007). As alterações das condições a partir do hospedeiro mamífero para o intestino médio do flebótomo, tais como a diminuição da temperatura e o aumento do pH, provocam o desenvolvimento do parasita no vetor, de amastigotas para promastigota.

O sangue ingerido passa para a região posterior do estômago ou estômago abdominal, no qual é rapidamente envolvido pela membrana peritrófica e entre 1 a 2 dias depois, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas com pouca mobilidade e com multiplicação ativa, onde após 48h a multiplicação abrande e ocorre a diferenciação em nectomonas, formas alongadas com muita mobilidade. Estas são formas migratórias que se acumulam na extremidade anterior da membrana peritrófica que após desintegração por ação de quitinases, são libertadas para o estômago abdominal, no caso dos flebótomos vetores do subgênero *Viannia*, ou para o estômago torácico, no caso dos flebótomos vetores do subgênero *Leishmania* onde se vão ligar ao epitélio gástrico através do flagelo, evitando assim a expulsão durante a diurese (Bates, 2007; Killick-Kendrick, 2002). Esta capacidade de conseguir “escapar” sem ser eliminado durante a digestão e de se conseguir anexar é determinante na classificação de uma espécie flebotomínica como vetora. As formas nectomonas libertadas atingem a válvula estemodeal, onde se diferenciam em leptomonas. As formas leptomonas, são responsáveis pela secreção do “gel secretor dos promastigotas”- PSG, uma glicoproteína filamentosa que forma uma matriz gelatinosa que desempenha um papel significativo na transmissão do parasita (Sadlova *et al.* 2016). Algumas das nectomonas/leptomonas aderem à superfície da válvula e diferenciam-se em haptomonas (Killick-Kendrick *et al.* 1974). Finalmente algumas das leptomonas diferenciam-se em promastigotas metacíclicos (Rogers *et al.* 2002). Pensa-se que o PSG juntamente com as haptomonas têm como função bloquear parcialmente a válvula estemodeal, dificultando a entrada de sangue durante a refeição sanguínea. O inseto é assim, obrigado a realizar várias picadas, facilitando a expulsão das formas metacíclicas infetantes (Killick-Kendrick, 1990).

4. Leishmaniose felina (LFe)

Atualmente, sabe-se que o gato doméstico é suscetível à infecção natural por várias das espécies de *Leishmania* que infetam o cão e o Homem, nomeadamente *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo e *Leishmania infantum* tanto no Novo Mundo como no Velho Mundo (Pennisi *et al.* 2015).

Embora o cão seja o principal hospedeiro e reservatório da LV humana causada por *L. infantum*, o envolvimento de outros hospedeiros na epidemiologia da leishmaniose não deve ser descurado. Nos últimos anos um número significativo de casos de infecção e doença por *L. infantum* têm sido descritos em gatos residentes em países endémicos de leishmaniose (Figura 6), pelo que estes animais podem provavelmente atuar como reservatório alternativo aos cães em zonas endémicas, em lugar de serem considerados hospedeiros acidentais (Maia *et al.* 2008; 2010; 2014; Maia & Campino, 2011). Várias são as razões para equacionar que os gatos possam ter um papel no ciclo biológico do parasita, nomeadamente: i) serem naturalmente suscetíveis à infecção por *L. infantum*, normalmente com ausência de sinais clínicos; ii) serem uma fonte de alimentação sanguínea para vetores biológicos competentes; iii) apresentarem parasitas na pele ou sangue periférico em número suficiente para que possam ser transmitidos e infetar os vetores (Giudice & Marty, 2003; Maia & Campino, 2011). Contudo, é difícil determinar qual o seu papel na manutenção e disseminação desta parasitose.

O primeiro caso de leishmaniose felina foi relatado por Sergeant, Lombard & Quilichini, 1912, na Argélia, num gato que vivia na mesma casa onde um cão e uma criança tinham sido diagnosticados com leishmaniose visceral (Maia & Campino, 2011).

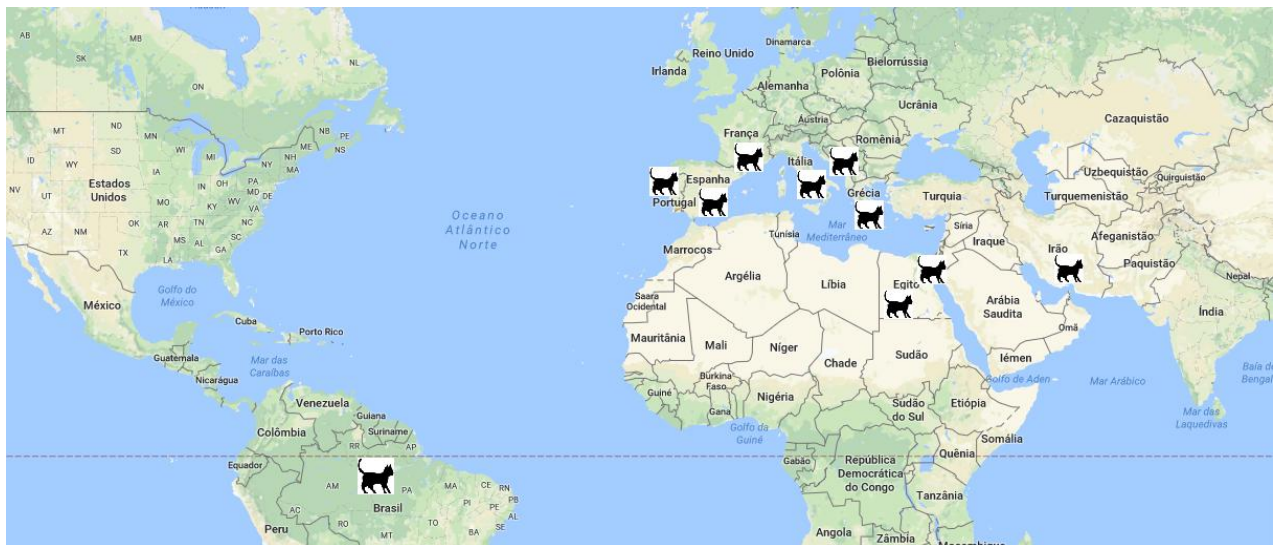


Fig. 6 Detecção da infecção por *Leishmania infantum* em gatos em países endêmicos de leishmaniose (imagem do autor, adaptado de Pennisi *et al.* 2015)

O aumento da população felina e um maior controlo da leishmaniose em cães, poderá levar a um aumento da prevalência da infecção em gatos. Nos últimos quinze anos, a seroprevalência em gatos infetados por *Leishmania* spp. em regiões endêmicas variou entre 0 a 68%, enquanto que a prevalência por métodos moleculares através da técnica de PCR variou entre 0 a 61% (Pennisi *et al.* 2015). No entanto, as diferenças que são observadas na prevalência da infecção nas populações de gatos para as que são observadas em cães, poderão estar relacionadas com as diferenças na resposta imune, na preferência hemática dos vetores, na resistência inata ao parasita (Lopes *et al.* 2017), quer pela subnotificação da doença e pelo desconhecimento da mesma por parte dos médicos veterinários (Ayllón *et al.* 2008). Fatores imunossupressores, tais como infeções pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucose felina (FeIV) e vírus da peritonite infecciosa felina, doenças autoimunes (e.g. pênfigo foliáceo) e tumores (e.g. carcinoma espinocelular) foram associados por alguns autores ao aparecimento da doença causada por *Leishmania* uma vez que prejudicam a resposta celular (Spada *et al.* 2013). No entanto na maior parte dos rastreios epidemiológicos não se observou uma associação entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* ou de DNA

de *Leishmania* e a positividade em relação ao FIV, FeIV ou parasitoses concomitantes (*Toxoplasma gondii*) (Martín-Sánchez *et al.* 2007; Cardoso *et al.* 2010; Maia *et al.* 2010).

Um ponto crucial para o gato ser considerado um bom reservatório, é que o gato raramente manifesta a doença conseguindo controlar melhor a infecção (Basso *et al.* 2016). Ao contrário do que ocorre na LCan, onde se observa uma produção excessiva de anticorpos não protetores, a ausência de uma resposta humoral por parte do sistema imunitário felino poderá estar relacionada com a capacidade do gato em controlar a infecção, mantendo a invasão e sobrevivência dos parasitas nos diversos órgãos reduzida sem a produção de anticorpos nem o desenvolvimento de doença (Maia & Campino, 2011). Embora haja pouca informação sobre a resposta imunitária felina contra a infecção por *Leishmania spp.*, Rodriguez *et al.* (2002) analisaram imunohistoquimicamente em lesões cutâneas, oculares e orais de um felino co-infetado por FIV as citocinas associadas à infecção pelo parasita. Os resultados desse estudo, evidenciaram uma boa resposta imunitária local que poderá ser a responsável pelo controlo da infecção por *Leishmania* em felinos e por impedir a sua disseminação sistêmica (Rodriguez *et al.* 2002).

Tal como nos cães, a maioria dos gatos infetados não desenvolvem sintomatologia e quando aparece, os sinais clínicos são geralmente inespecíficos tais como febre, anorexia, perda de peso, vômitos e diarreia (Maia & Campino, 2011). Nos cães, consideram-se os métodos serológicos quantitativos e a demonstração de DNA do parasita por técnicas moleculares (Solano-Gallego, *et al.* 2014). A maioria das técnicas de diagnóstico para a infecção por *Leishmania* que estão disponíveis para cães também são utilizadas em gatos, embora não exista nenhuma técnica de referência ou “gold standard” para o diagnóstico da doença e da infecção em gatos (Hernandez-Cortés, *et al.* 2013).

As lesões cutâneas predominam no quadro clínico de LFel devido a *L. infantum*. Os nódulos cutâneos e mucocutâneos de tamanho variável são mais frequentemente localizados na cabeça, incluindo pálpebras (Figura 4), nariz e lábios, ou nas partes distais dos membros (Pennisi *et al.* 2015). Erosões ou úlceras nas mucosas ou junções mucocutâneas e mucosas congestionadas também já foram descritas, assim como lesões

oculares (uveíte, panuveíte, glaucoma), corrimento ocular e nasal e ainda otites (Leiva *et al.* 2005; Vita *et al.* 2005). Os flebótomos alimentam-se preferencialmente nas regiões do corpo que possuem menor quantidade de pêlo, razão pela qual a maioria dos casos de leishmaniose felina tenham sido descritos em animais de pêlo curto (Pennisi *et al.* 2013). Pode haver também alterações bioquímicas, como hiperglobulinemia com elevação das gama e beta-globulinas, assim como alterações nos parâmetros hepáticos e renais (Rufenacht *et al.* 2005).



Fig. 7 Conjuntivite nodular (pálpebra superior) e dermatite ulcerativa em membro anterior (Pennisi *et al.* 2015)

5. Interação parasita-hospedeiro

A invasão do hospedeiro vertebrado por *Leishmania* é um processo complexo determinado pela interação de vários fatores relacionados com o hospedeiro e com o parasita. Existem dois elementos fundamentais que justificam a patogenicidade da *Leishmania*: o primeiro elemento resulta do facto do parasita se encontrar e multiplicar nas células do sistema fagocítico mononuclear, originando uma alteração funcional com diminuição da capacidade fagocítica e da sua atividade como célula apresentadora de antigénio, bem como irá originar a destruição da célula parasitada; o segundo elemento traduz-se numa reação parcialmente imunomediada, resultado de uma resposta imunitária ineficaz, em que os mecanismos celulares e humorais constituem elementos imunopatológicos (Campillo & Vázquez, 2002). Assim, para a infeção intracelular ser bem sucedida tem de haver a inibição da ativação das defesas inatas das células hospedeiras, e que não haja uma resposta imune protetora do hospedeiro; a falta de resposta permite então que os parasitas sobrevivam, se repliquem e prossigam com o seu ciclo infectando novos macrófagos. O seu principal alvo são os macrófagos, mesmo sendo células especializadas na fagocitose de agentes patogénicos, as leishmanias possuem características de resistência específicas que lhes permitem resistir perante o sistema de defesa imunitária do hospedeiro (Maia *et al.* 2008). As formas promastigotas procíclicas ativam o complemento e são logo fagocitadas e as formas metacíclicas desenvolvem mecanismos que lhes permitem bloquear a atividade lítica do complemento (Zambrano-Villa *et al.* 2002). Duas moléculas parasitárias estão identificadas como responsáveis pela virulência em *Leishmania*: glicoproteína de 63 kDa (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG). O LPG e a gp63 localizam-se na membrana plasmática do parasita e estão envolvidas na ativação da fração C3 do complemento, atuando na fase crucial da interação parasita-hospedeiro, estimulando a ligação ao macrófago e a sua proteção dentro dos fagolisossomas, influenciando ainda a migração dos monócitos (Sádlová, 1999). Durante a fagocitose, há a formação do fagolisossoma, onde o fagossoma contendo o parasita se funde com os lisossomas e por ação do LPG pode haver a inibição dessa fusão.

Outro fator que também intervém no estabelecimento da infeção é a saliva do vetor, que parece desempenhar um papel relevante na capacidade infecciosa do parasita,

uma vez que contém substâncias ativas que aumentam a infecciosidade das formas promastigotas de *Leishmania* (Titus & Ribeiro, 1988). Uma vez que os promastigotas metacíclicos são inoculados, a presença dos flagelos juntamente com substâncias que o flebótomo liberta durante a picada, estimulam a produção da quimiocina CXCL1 que favorece a migração de fagócitos e granulócitos até ao lugar da infeção.

O parasita induz uma resposta inflamatória através da ativação do complemento e da sinalização do recetor de reconhecimento de padrões. Um ambiente inflamatório enriquecido por quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias é importante para atrair e maturar as células dendríticas e os macrófagos em células apresentadoras de antígenos (APC) (Hosein *et al.* 2017; Campino & Maia, 2010). A resposta celular inicia-se com a atuação das APC, que são macrófagos que tenham fagocitado o parasita e que apresentam antígenos do parasita, associados às moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) da sua membrana externa. O complexo antígeno-molécula MHC II é reconhecido pelos recetores de membrana dos linfócitos Th CD4⁺, que vão promover uma determinada resposta, de acordo com a subpopulação (Th1 ou Th2) de linfócitos que for ativada. As células Th1 são atraídas para o sítio da infeção, produzindo CCL-2, que por sua vez ativa as células “Natural Killer” (NK). As células NK, que também seguem para o local da picada, são a principal fonte do IFN- γ , que favorece a diferenciação das células T CD4⁺ Th1. Quando a subpopulação Th1 é ativada ocorre uma produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , que induz a ativação dos macrófagos, a destruição intracelular do parasita por ação do óxido nítrico (NO) (Otranto D. *et al.* 2004). Outro aspeto importante na ativação dos macrófagos é induzi-los à produção de radicais tóxicos e libertação de citocinas IL-12 e IL-18 que medeiam respostas de hipersensibilidade do tipo retardada (Hernandez, 2012; Hosein *et al.* 2017; Maia *et al.* 2008). Já no caso de uma resposta imunitária não protetora, a resposta celular é do tipo Th2, com produção elevada de anticorpos, estando associada à progressão de doença. Ao produzir as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 estas vão inibir a ativação dos macrófagos e as respostas linfoproliferativas, e por outro lado vão promover a proliferação dos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas, levando a uma resposta imunitária do tipo humoral. As citocinas IL-4 e IL-10 vão regular negativamente a secreção de IL-12, inibindo a diferenciação das células numa

subpopulação Th1, diminuindo assim a resposta celular. Por outro lado, a produção de IL-4 vai promover a produção da IgG1 e da IgE.

6. Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses são um problema para a saúde pública, especialmente em áreas pobres, estimando-se que existam a nível mundial 12 milhões de pessoas infectadas e mais de 350 milhões se encontram em risco de contrair a doença (WHO, 2017).

Devido ao elevado número de humanos que habitam em áreas de risco e à falta de vacinas disponíveis para as diferentes formas clínicas, as leishmanioses continuam a ser um problema de saúde muito sério em todo o mundo. Para além dos problemas anteriormente descritos, a dinâmica da sua transmissão é muito complexa, pois existe uma diversidade enorme de espécies de *Leishmania* envolvendo vários reservatórios e diferentes vetores (Galvis-Ovallos *et al.* 2017). A propagação das leishmanioses é influenciada por variados fatores de risco, como: as alterações climáticas, as alterações ambientais provocadas pelo homem (desflorestação e urbanização) e migração de zonas rurais para as zonas urbanas (Desjeux, 2001).

No caso da doença em humanos, o tropismo do parasita e quadro clínico são divididos em três grupos: os que causam leishmaniose visceral (LV), responsáveis pelo aparecimento de sintomatologia sistémica podendo em casos graves levar à morte do hospedeiro, os que causam leishmaniose cutânea (LC) menos grave e de mais fácil tratamento e os que causam leishmaniose mucocutânea (LMC) levando à formação de lesões nas mucosas (OMS, 2010; 2012). As manifestações clínicas dependem da espécie de *Leishmania* (WHO, 2017).

A LV é um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. A LV é causada por espécies do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo, e *L. chagasi* no Novo Mundo). A incidência anual total na Europa é estimada em aproximadamente 1100 a 1900 casos. Os parasitas invadem as células do sistema mononuclear fagocítico do baço, fígado medula óssea e outros órgãos linfóides, onde se

multiplicam, causando hipertrofia de órgãos (hepatoesplenomegalia) e disfunção dos mesmos (Wulsten, 2017).

Devido à natureza benigna da LC, que raramente requer hospitalização, a subnotificação é mais frequente do que a LV. A incidência estimada anual é cerca de 10000 a 17000. A LC é causada por várias espécies de *Leishmania*, tais como *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, ou *Leishmania panamensis* no Novo Mundo e por *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica* no Velho Mundo (Campino & Abranches, 2002). Esta doença abrange uma série de variantes clínicas, que vão desde uma única lesão de cura espontânea a lesões múltiplas localizadas com evolução crónica. A lesão “clássica”, normalmente localizada em áreas expostas do corpo (braços, pernas e face) (Consuelo & Craft, 2009), caracteriza-se pela formação de um nódulo local induzido pela picada do vetor que ulcera e cura espontaneamente.

A LMC ocorre nas Américas Central e do Sul. A principal espécie responsável pela infeção é *L. braziliensis* (McGwire, 2013), embora se encontrem reportados casos causados por *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (Dedet, 1994; Desjeux, 2004). A doença evolui em duas fases, em que na primeira surge um nódulo localizado que ulcera e cura espontaneamente, mas após a aparente cura, e numa segunda fase que ocorre por metastização secundária dos parasitas para as mucosas oral e nasal e ocasionalmente para a mucosa da laringe e da faringe, causando lesões graves com destruição total ou parcial das mesmas (Dedet & Pratlong, 2003). Estas lesões são normalmente associadas à congestão nasal, dor, eritema, edema, halitose, sangramento, rinorreia serosa, epistaxis, disfagia e disfonia.

7. Leishmaniose em Portugal

Em Portugal, tal como em vários países do Sul da Europa, a epidemiologia da leishmaniose alterou-se deixando de ser uma doença que afetava principalmente as crianças para estar associada a casos de coinfeção em adultos imunocomprometidos pelo vírus da imunodeficiência humana. As alterações climáticas e socioeconómicas, assim como a resistência do parasita e do vetor aos fármacos e inseticidas em uso, podem

favorecer a emergência ou reemergência da leishmaniose em Portugal (Martins *et al.* 2014).

Em Portugal, a leishmaniose causada pela espécie *L. infantum* é endémica, sendo a apresentação clínica predominante a leishmaniose visceral. O primeiro caso de leishmaniose humana foi descrito por Dyonísio Alvares em 1910, numa criança de nove anos de idade, residente em Lisboa. A doença é de notificação obrigatória desde 1948 (Portaria nº 1071/48, de 31 de Dezembro). Já a forma cutânea de leishmaniose, é considerada uma doença muito rara. A maioria dos casos, de origem rural, ocorreu em adultos provenientes das bacias hidrográficas dos rios Douro, Tejo e Sado (Campino & Abranches, 2002).

De acordo com o estudo realizado por Campino *et al.* (2006) o principal zimodemo responsável pela doença em Portugal é MON-1, tendo sido detetado em parasitas isolados de humanos, canídeos, raposas e vetores. Sabe-se que a LCan é considerada uma doença endémica no país, com uma prevalência que pode atingir cerca de 20% ou mais, em localidades de regiões endémicas (Campino & Maia, 2010). No rastreio nacional realizado em 2009 obteve-se uma seroprevalência global de 6,3%, com prevalências superiores a 12% nos distritos de Castelo Branco, Beja e Portalegre e de 4,1% no distrito de Faro (Cortes *et al.* 2012).

O papel dos gatos na epidemiologia da leishmaniose também tem sido avaliado. Estudos abrangendo o território continental mostraram prevalências de 0,3% no norte e centro (Vilhena *et al.* 2013) e 9,9%, no sul (Maia *et al.* 2014).

Em 2005, Vaz *et al.* realizaram uma pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* através da técnica da IFI em gatos errantes da região de Lisboa onde apenas um (1,03%) em 97 animais foi positivo (diluição de 1:160). Em 2008, Faria efetuou um estudo epidemiológico em 50 gatos domésticos e 25 gatos de gatil, no concelho de Vila Franca de Xira, não obtendo nenhum resultado positivo pela técnica de IFI. Maia *et al.* nos dois estudos que fez (2008 e 2010), nas regiões de Lisboa e Setúbal, por PCR convencional detetou a presença de DNA do parasita em 30,4% (7/23) dos gatos errantes e em 20,3% (28/138) dos gatos domésticos. A maioria dos animais não apresentava sinais clínicos e a deteção de anticorpos através de IFI foi de 1,3% (Maia *et al.* 2010). Em 2011, Oliveira

pesquisou a infecção por *L. infantum* em 50 gatos de uma Associação na Região de Setúbal (através de real-time PCR em sangue total periférico), tendo ocorrido detecção do DNA do agente em apenas um animal testado (2%). Em 2013, Pinto, estudou a prevalência de 204 gatos (domésticos e errantes) residentes no concelho de Cascais, obtendo uma prevalência de 9,8%. Em 2012, Ramos estudou a prevalência de 217 gatos (domésticos e errantes) residentes na região de Olhão, obtendo uma prevalência de 0,5%. Para além da detecção do parasita e de anticorpos específicos (Cardoso *et al.* 2010; Maia *et al.* 2008; 2010; 2015a), vários casos clínicos de leishmaniose felina têm sido relatados (Durão *et al.* 1994 Marcos *et al.* 2009; Sanches *et al.* 2011; Maia *et al.* 2015b; Pimenta *et al.* 2015; Basso *et al.* 2016).

São conhecidas em Portugal cinco espécies de flebótomos, sendo quatro do género *Phlebotomus* (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi* e *P. sergenti*) e uma do género *Sergentomyia* (*Sergentomyia minuta*) (Alves-Pires, 2000). Os principais vetores de *L. infantum* no nosso país e em toda a Europa Ocidental são *P. perniciosus* e *P. ariasi* (Campino & Maia, 2010), sendo o primeiro o responsável pela maioria das infeções na Península Ibérica (Maia *et al.* 2010) e a espécie mais abundante na região de Lisboa e no Algarve (Afonso & Alves-Pires, 2008). De acordo com os resultados obtidos por técnicas geostatísticas e baseadas em dados recolhidos entre 1978 e 2004, em 104 localidades, as áreas de maior risco para a presença das espécies comprovadamente vetoradas são o Noroeste e o Algarve para *P. perniciosus* e o Nordeste para *P. ariasi* (Baptista *et al.* 2007). Na zona do Algarve e até ao momento, só foram encontrados infetados exemplares de *P. perniciosus* (Maia *et al.* 2009; 2015).

8. Métodos de diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de leishmaniose é complicado pela patologia clínica da doença, variando de simples formas cutâneas a formas viscerais. Recomenda-se que tenha tido em conta a anamnese e dados epidemiológicos da região, os sinais clínicos, alterações clinicopatológicas do paciente e os resultados do diagnóstico laboratorial utilizando métodos parasitológicos, serológicos e moleculares (Gramiccia, 2011; Langoni *et al.* 2015). Um método de diagnóstico eficaz, para além de ser capaz de confirmar uma suspeita clínica, deve detetar a infecção em portadores assintomáticos, apresentar elevada

sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, ser de fácil execução, barato e viável em laboratórios regionais ou adaptável para condições de campo (Maia & Campino, 2008).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose baseia-se em métodos parasitológicos (detecção e visualização do parasita por microscopia), métodos moleculares (detecção de DNA parasitário) e métodos imunológicos (detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*) (Maia & Campino, 2008; Maia *et al.* 2009).

8.1 Diagnóstico parasitológico

8.1.1 Exame direto e cultural

O exame direto consiste na visualização em microscópio ótico de formas amastigotas do parasita em esfregaços de tecidos, órgãos ou aspirados de gânglios linfáticos, medula óssea, baço, fígado ou pele infetados, após fixação e coloração adequadas (Maia & Campino, 2008). Este método tem como vantagens a fácil manipulação, conservação do material biológico e a rapidez do resultado. Contudo, a sensibilidade da técnica é baixa (principalmente em animais sem sintomatologia) e também depende da experiência do observador (Laurenti, 2009).

O diagnóstico parasitológico pode também ser estabelecido por meio da detecção do parasita em exame cultural em meios específicos, bifásicos (meio “Novy-MacNeal-Nicolle”) ou líquidos (RPMI, Schneider). Biópsias ou punções aspirativas de diferentes órgãos ou tecidos são colocadas nos meios de cultura nos quais as formas amastigotas, presentes no material biológico se transformam em formas promastigotas. É um método com maior sensibilidade que o exame microscópico. Apesar de apresentar 100% de especificidade, a obtenção do resultado através do exame cultural é demorada e a eficácia condicionada pela possibilidade de contaminação bacteriana ou fúngica (Laurenti, 2009). A detecção parasitológica continua a ser o padrão para o diagnóstico devido à sua alta especificidade, contudo as punções aspirativas são invasivas (Maia & Campino, 2008).

8.2 Diagnóstico molecular

De entre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada como ferramenta no diagnóstico para detecção e identificação de espécies de *Leishmania*, através da amplificação seletiva de sequências de DNA do parasita a partir dos ácidos nucleicos de uma amostra biológica. A detecção de DNA do parasita é possível em vários tecidos, incluindo medula óssea, fígado, baço, biópsias cutâneas, aspirados de gânglios linfáticos, sangue e cortes histológicos de tecidos parafinados (Langoni *et al.* 2015).

A sensibilidade e especificidade da técnica depende das sequências iniciadoras (“primers”), do número de cópias da sequência alvo, do método de extração de DNA, do produto biológico utilizado e do protocolo de PCR (Cortes *et al.* 2004; Maia & Campino, 2008).

No caso do diagnóstico da leishmaniose os “primers” podem ser desenhados com base nos minicirculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) (Cortes *et al.* 2004) ou nos genes que codificam para a pequena subunidade do RNA ribossómico (SSU rRNA ou 16S rRNA) (Van Eys *et al.* 1992). A principal desvantagem da técnica de PCR é o facto de um resultado positivo não confirmar a doença (Lombardo *et al.* 2012).

A “Nested”-PCR (nPCR) é outra técnica utilizada do diagnóstico molecular, mais sensível que a PCR convencional, em que são realizados dois processamentos com um ou dois pares de “primers”, no entanto, é propensa a um maior risco de contaminação (Paltrinieri *et al.* 2010). Albuquerque *et al.* (2017) mostraram que a nPCR tendo como alvo SSU rRNA é o protocolo mais adequado para detetar infeções por *Leishmania* em cães que não apresentam sinais clínicos. Nesse estudo, 44% (66/150) das amostras positivas foram detetadas através do protocolo de nPCR SSU rRNA-PCR em medula óssea em cães clinicamente suspeitos.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é também utilizada no diagnóstico molecular permitindo a monitorização contínua da amplificação de sequências de DNA específicas e a quantificação precisa do DNA do parasita presente em cada amostra resultando num diagnóstico mais preciso e sensível (Francino *et al.* 2006). As vantagens da qPCR em comparação com as técnicas convencionais de PCR são: a redução no

tempo de execução, a análise simultânea de um elevado numero de amostras e o facto de facilitar o controlo da carga parasitária durante e após a instituição de um tratamento (Francino *et al.* 2006; Maia & Campino 2008).

Na maioria dos estudos realizados em gatos, a sensibilidade da deteção do parasita foi muito superior através de PCR comparativamente à serologia ou à citologia (Martín-Sánchez *et al.* 2007; Ayllón *et al.* 2008; Maia *et al.* 2010; Pennisi *et al.* 2012; Sobrinho *et al.* 2012 Perillo *et al.* (2013)).

8.3 Diagnóstico serológico

Os métodos de diagnóstico serológico, baseiam-se na deteção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania*, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (Maurício *et al.* 1995). As técnicas mais utilizadas no diagnóstico da LV humana e CanL são Imunofluorescência indireta (IFI) e “Enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) (Laurenti, 2009).

Deve ter-se em conta que a presença de anticorpos não implica sempre a existência de infeção/doença, sendo que resultados positivos através das técnicas serológicas podem significar apenas o contacto do animal com o parasita, podendo este nunca vir a manifestar a doença, ou significar uma reação cruzada com outros parasitas como por exemplo a toxoplasmose, levando a falsos-positivos (Gao *et al.* 2015). É aconselhável usarem-se duas técnicas serológicas, tanto quanto possível, diferentes nos seus fundamentos (Mauricio *et al.* 1995).

Este tipo de diagnóstico tem sido o mais utilizado para o diagnóstico da infeção por *Leishmania* em gatos, nomeadamente as técnicas de IFI, ELISA Teste de Aglutinação Direta (DAT) e Western Blot (WB) (Pennisi, 2014; Pennisi & Solano-Gallego, 2013b). Os gatos infetados por *Leishmania* frequentemente desenvolvem um baixo nível de anticorpos ou permanecem seronegativos (Poli *et al.* 2002; Martín-Sánchez *et al.* 2007), daí que a serologia convencional não seja um método muito útil e fiável nesta espécie (Poli *et al.* 2002; Martín-Sánchez *et al.* 2007). Nos gatos, está provado que ocorrem reações cruzadas na presença de *Trypanosoma cruzi* e outras espécies de *Leishmania*, tal como nos cães (Pennisi & Solano Gallego, 2013a). Assim, o

diagnóstico laboratorial de LFel não deve incluir somente métodos serológicos, mas também métodos parasitológicos diretos e/ou moleculares.

8.3.1 Imunofluorescência indireta (IFI)

A IFI é considerada a técnica serológica de referência pela organização mundial de saúde animal. Geralmente usa como antigénio a forma promastigota inteira do parasita, cultivada *in vitro*, sendo altamente específica e sensível para a deteção de anticorpos específicos em cães infetados/expostos ao parasita (Alvar *et al.* 2004; Maia & Campino, 2008). Esta técnica semi-quantitativa apresenta sensibilidade e especificidade elevadas no diagnóstico de LCan, apresentando uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 98%. Nos gatos, este é o método serológico mais utilizado (Pennisi, 2014). Em 30 casos clínicos em felinos na Europa, em que se utilizou a técnica de IFI, o limiar de positividade utilizado variou entre 1:2 e 1:100 e em 5 desses casos, este título foi ≤ 80 , considerado como suspeito no caso dos cães. Quando se utilizam diluições muito baixas, não se pode excluir a ocorrência de reações cruzadas (Pennisi, 2014)

Contudo a IFI necessita de equipamento dispendioso (microscópio de fluorescência) e experiência na execução, leitura e interpretação dos resultados (Maia&Campino, 2008). Outra das limitações da técnica quando aplicada a amostras de soro humano é a ocorrência de reações cruzadas com a doença de Chagas, malária, schistosomose e tuberculose pulmonar (Gontijo & Melo, 2004).

8.3.2 Contraimunoelectroforese (CIE)

A técnica de CIE baseia-se na visualização de um precipitado em forma de arco em gel de acetato de celulose, devido à interação entre os antígenos de *Leishmania* e anticorpos presentes na amostra de soro submetida a eletroforese (Maia & Campino, 2008). Apesar de ser uma técnica qualitativa, à semelhança do que acontece na IFI a sensibilidade e especificidade também são elevadas. Esta técnica utiliza quantidades mínimas de antígeno, é de fácil execução e leitura para além de permitir a obtenção de

um resultado em pouco tempo. Em conjunto com a IFI, são as técnicas utilizadas pelo Grupo de Leishmanioses/UEI Parasitologia Médica no IHMT, na análise de soros caninos e humanos, tanto em diagnóstico como em inquéritos epidemiológicos.

8.3.3 Teste de aglutinação direta (DAT)

O antígeno usado na DAT consiste em promastigotas integrais em suspensão ou numa forma liofilizada (Maia & Campino, 2008). Após preparação do antígeno, realizam-se diluições seriadas do soro a testar ficando a incubar durante 18 horas à temperatura ambiente, para que posteriormente o resultado seja lido visualmente contra um fundo branco. Esta técnica apresenta uma sensibilidade de 100% e 98,9% de especificidade quando aplicada no diagnóstico da LCan (Maia & Campino, 2008).

8.3.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Este método baseia-se na ligação dos anticorpos presentes na amostra ao antígeno adsorvido aos poços da placa. Adicionando o conjugado enzimático e o substrato correspondente há emissão de luz que pode ser lida em espectrofotómetro a um determinado comprimento de onda, o que permite a leitura dos resultados. A sensibilidade e a especificidade da técnica dependem dos antígenos utilizados, que incluem principalmente extratos solúveis de promastigotas e proteínas recombinantes ou purificadas. Os extratos de parasitas inteiros são sensíveis à deteção de infeções caninas subclínicas ou clínicas mas fornecem uma especificidade menor (Maia *et al.* 2008; Gontijo & Melo, 2004). Os testes com parasita completo são muito sensíveis para infeções clínicas (100%) e subclínicas (94,1% - 100%) mas têm menor especificidade. Neto *et al.* (2011) realizaram um estudo utilizando soros de gatos provenientes de Araçatuba (São Paulo), uma área considerada endémica de leishmaniose onde compararam a sensibilidade da deteção de anticorpos específicos de *Leishmania* usando como antígenos parasitas completos, proteínas purificadas e recombinantes. Os resultados obtidos apontaram para uma maior sensibilidade dos parasitas completos em identificar as amostras seropositivas.

9. Tratamento

O tratamento da leishmaniose depende de vários fatores, incluindo o quadro clínico da doença, a espécie de *Leishmania* e localização geográfica.

Os fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses humanas e canina incluem os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), a aminosidina, a miltefosina, a anfotericina B, a pentamidina e mais raramente, os azóis (cetoconazol, miconazol, flucinazol e itraconazol) (Oliva *et al.* 2010).

O tratamento mais usado na LCan é o antimoniato de meglumina que inibe a glicólise e a oxidação dos ácidos gordos, bloqueando o metabolismo do parasita (Miró *et al.* 2008), normalmente em combinação com o alopurinol. Uma grande percentagem de animais tratados mostra uma clara recuperação clínica. Apesar da alta toxicidade associada a estes medicamentos, nos cães parece que os efeitos adversos são reduzidos (Ferrer, 2002).

O alopurinol é um fármaco leishmanioestático de administração oral economicamente mais acessível que os antimoniais, com alguns efeitos secundários, podendo causar cálculos renais. Este fármaco, tem a particularidade, quando é metabolizado pelo parasita vai ser produzido um análogo inactivo da iosina; este análogo é incorporado no RNA do parasita causando síntese errónea de proteínas. Os cães recuperam dos sinais clínicos, havendo uma diminuição considerável da carga parasitária.

A anfotericina B tem sido muito utilizada no tratamento de leishmaniose humana. O seu mecanismo de ação é baseado na ligação do fármaco ao ergosterol da membrana celular do parasita que vai provocar uma desorganização na membrana formando poros que alteram a permeabilidade ao potássio intracelular, levando à morte do parasita por lise osmótica (Da Silva, 2007).

Também a miltefosina, uma alquilfosfocolina desenvolvida inicialmente como um quimioterápico anti-neoplásico, tem vindo a ser usada no tratamento da leishmaniose, quer humana, quer canina (Oliva *et al.* 2010).

O tratamento dos cães com leishmaniose resulta numa melhoria clínica, numa diminuição dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e na recuperação da capacidade de defesa através de uma resposta imune adequada. No entanto, o tratamento não leva na maioria dos casos à cura parasitológica, e como tal não previne uma recorrência dos sinais clínicos (Ikeda-Garcia *et al.* 2007; Miro *et al.* 2008). A localização intracelular do parasita, o desenvolvimento de resistência aos fármacos e a necessidade de uma resposta imunitária celular que acompanhe a ação dos fármacos, são fatores que estão associados a ineficácia do tratamento.

Não existindo uma terapêutica específica para o tratamento da LFel, o alopurinol, o antimoniato de meglumina e o cetoconazol foram utilizados em alguns animais levando à remissão dos sinais clínicos e à normalização dos parâmetros bioquímicos. Segundo Pennisi *et al.* (2015), o alopurinol (10mg/Kg 12h ou 20mg/Kg 24h) é o fármaco mais usado no tratamento da leishmaniose em gatos.

10. Medidas de controlo

A OMS preconiza como ferramentas de controlo, três estratégias principais: (i) controlo dos vetores, nas vertentes biológica, ecológica e química; (ii) controlo dos parasitas, com a sua eliminação nos hospedeiros e nos reservatórios e (iii) através da proteção individual e coletiva da população humana e canina.

Para evitar os riscos de transmissão, existem várias medidas de proteção individuais que as populações que são mais afetadas deveriam adotar, embora o melhor método para prevenir qualquer doença causada por parasitas transmitidos por vetores é reduzir o contacto entre o vetor e o humano e diagnosticar a tempo, para o tratamento ser mais eficaz. Assim sendo, deve-se usar os métodos de proteção individual tais como o uso de repelentes (ex. DEET (N,N-dimetil-meta-toluamida), óleo de citronela e óleo de Neem) e inseticidas.

Sabendo que não há nenhuma medida preventiva que seja 100% eficaz, uma grande limitação na prevenção e controlo desta doença nos gatos é que, ao contrário dos cães, os repelentes tópicos à base dos piretróides com ação comprovada contra os flebótomos, nomeadamente coleiras impregnadas com deltametrina ou unções punctiformes com permetrina, são tóxicos para estes animais (Gramiccia, 2011).

As medidas profiláticas diretamente associadas ao felino consistem em sensibilizar os donos a manter os animais dentro de casa, pelo menos nas primeiras horas do dia e ao anoitecer, devido ao comportamento noturno e crepuscular dos flebótomos. No caso das espécies felinas, ainda não foi desenvolvido um antiparasitário com atividade sobre flebotomíneos, no entanto no mercado português existe uma coleira (Seresto®), que possui uma combinação de imidaclopride (10%) e flumetrina (4,5%), com efeito sinérgico entre ambas, para cães e gatos, com efeito repelente e inseticida (Bayer, 2012). Mais recentemente Otranto *et al.* (2017) constataram que os gatos que usavam a coleira Seresto® estavam protegidos contra o parasita uma vez que a prevalência de *Leishmania* era mais baixa do que nos gatos que não usavam coleira.

Nos cães, a prevenção é a medida mais importante para a saúde do animal uma vez que os tratamentos existentes não permitem eliminar definitivamente a infeção, aconselhando-se o uso de repelentes/inseticidas em combinação com outras medidas preventivas, tais como a vacinação (Killick-Kendrick *et al.* 1997; Miró *et al.* 2008).

A vacinação pode ser adotada concomitantemente com outras medidas de controlo de modo a reduzir as taxas de transmissão (Wylie *et al.* 2014). Nenhuma vacina para a leishmaniose humana está disponível atualmente devido à grande variabilidade de espécies de *Leishmania* que afetam as pessoas e à falta de sucesso na produção de vacinas efetivas. Nem está ainda disponível para gatos. Em contraste, três produtos vacinais encontram-se comercializados para o controlo da LCan: Leish-Tec®; CaniLeish®; Letifend®, a primeira no Brasil, os outros na Europa (Miró *et al.* 2017). A vacinação parece ser uma estratégia eficaz para proteger os cães (Chappuis *et al.* 2007) e reduzir a incidência nos casos em humanos (de Souza Testasica *et al.* 2014).

II. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo a determinação da prevalência da infecção por *Leishmania* sp. em gatos errantes da região do Algarve, e como objetivos específicos:

- 1) Pesquisar a presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* através de diferentes técnicas serológicas;
- 2) Pesquisar a presença de DNA de *Leishmania* em diferentes amostras biológicas;
- 3) Determinar a relação das características intrínsecas (género, idade e pelagem) e sinais clínicos com a presença de anticorpos anti-*Leishmania* ou DNA do parasita.

1. Material e Métodos

1.2 Área de estudo

A região estudada corresponde a Faro, localizada na região do Algarve. Esta região é na zona mais meridional de Portugal continental (Figura 8), limitada a sul e a oeste pelo Oceano Atlântico, a norte contata com o Distrito de Beja e a leste faz fronteira com Espanha através do Rio Guadiana. O Algarve encontra-se a uma latitude de 37º Norte e a uma longitude de 7º25' e 9º00' Oeste, apresenta um comprimento de Norte a Sul entre 30-40 quilómetros (km) e cerca de 130-150 km Este-Oeste e ocupa uma superfície cuja área total de 4988,5 km². Faro é uma cidade portuguesa com cerca de 47 000 habitantes (INE,2013).

A área em estudo situa-se, do ponto de vista climático num domínio tipicamente mediterrâneo, com uma estação seca prolongada em regra com duração de 5 meses. Esta estação seca conjuga-se com a estação mais quente, segundo os dados do INE referentes ao ano de 2009 a estação meteorológica de Faro/Aeroporto apresentava uma temperatura média do mês mais quente (Julho) de 25,2° C.

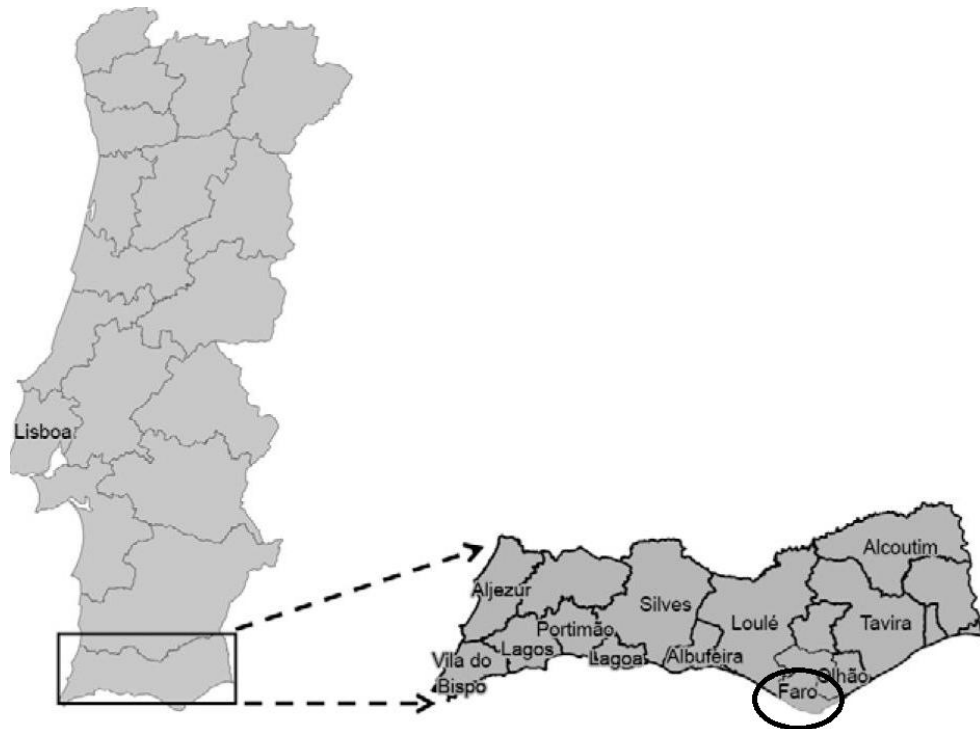


Fig. 8 Mapa de Portugal evidenciando a zona de estudo, Faro. (Adaptado de Maia *et al.* 2013)

1.3 Colheita das amostras biológicas

Entre Maio e Setembro de 2016 foram analisados, no total, 75 gatos errantes na região de Faro. Os gatos foram recolhidos no âmbito de um programa de captura, esterilização e recolocação (CER). Durante a recolha das amostras (sangue periférico e fragmento de pele da extremidade da orelha esquerda, o qual é realizado para identificação dos gatos que já foram esterilizados), foi preenchido para cada animal um questionário, de modo a se obter informações sobre idade, género e pelagem. No que diz respeito à idade, definiram-se intervalos, correspondendo a categoria de “Jovem” os animais com idade inferior a um ano de idade, a “Adulto” os animais de 1 ano até aos 7 anos e a “Sénior” os animais com mais de 7 anos. Foram também registados para cada animal, após exame físico realizado por um médico veterinário, a presença de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose nomeadamente: lesões oculares, alterações cutâneas, magreza e adenomegalia.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), da Universidade Nova de Lisboa (UNL). O manuseamento e recolha de produtos biológicos foram efetuados por médicos veterinários com base na boa prática e bem-estar animal.

As amostras foram enviadas para o laboratório de Leishmanioses da Unidade de Parasitologia Médica, do IHMT, UNL, onde foi realizado o trabalho de bancada.

1.4 Recolha de sangue periférico e de pele

Durante a sedação foram efetuadas colheitas de sangue em 68 animais e de um fragmento de pele da ponta da orelha esquerda em 73. A recolha de sangue foi realizada, após tricotomia e assepsia com álcool etílico a 70%, por venopunção de veias periféricas (veia cefálica, femoral ou jugular). Para recolha das amostras foram utilizadas seringas de 2 ml e agulhas de 25 G, colhendo-se cerca de 2 ml de sangue por gato: 1 ml foi transferido para um tubo com gel-ativador, para obtenção de soro destinado aos testes seroimunológicos e 1 ml foi transferido para um tubo com anticoagulante para posterior extração de DNA. Após centrifugação durante 10 minutos, o soro foi recolhido para tubos de 1,5 ml. Os fragmentos de tecido foram colocados em tubos de 1,5ml com soro fisiológico a 0,9% e antibiótico (penicilina e estreptomicina). As amostras (soro, sangue total e fragmento de pele) foram devidamente identificadas e guardadas a -20°C até posterior utilização.

1.5 Extração de DNA de sangue periférico e de pele

Para a extração de DNA a partir de sangue total, utilizou-se um método rápido comercial (Kit de extração de DNA genómico Citogene®, Citomed, Portugal). Deste modo, adicionou-se 300µl de sangue total a um tubo estéril de 1,5 ml contendo 900 µl de tampão de lise de eritrócitos. Incubou-se a temperatura ambiente, durante 1 minuto, invertendo o tubo durante a incubação. Seguidamente centrifugou-se durante 20 segundos a 20817g. Removeu-se o sobrenadante e de seguida adicionou-se 300 µl de

tampão de lise à suspensão celular e ressuspendeu-se várias vezes para lisar as células. De seguida adicionou-se 100 µl de solução de precipitação de proteínas e agitou-se no vórtex, para uniformizar. De seguida centrifugou-se durante 1 minuto a 20817g a +4°C, para formar um precipitado de proteínas e decantou-se o sobrenadante, contendo o DNA, para um novo tubo de 1,5 ml contendo 300µl de isopropanol a 100%, misturando a amostra. A amostra foi misturada sendo invertida cuidadosamente 50 vezes. Após a mistura da amostra, centrifugou-se durante 1 minuto a 16000 g a +4°C, onde se forma um pequeno precipitado de DNA. Após rejeição do sobrenadante adicionou-se 300 µl de etanol a 70%, e procedeu-se à inversão suave da mistura num total de 20 vezes para lavar o precipitado de DNA. Posteriormente realizou-se nova centrifugação, durante um minuto, a +4°C tendo-se descartado o etanol com cuidado e invertido o tubo com a tampa aberta sob papel absorvente, deixando de seguida a secar ao ar durante 30 minutos. Por fim adicionou-se 100 µl de tampão de hidratação, levando as amostras a incubar a 65°C durante 1 hora. O DNA foi guardado a -20°C até posterior utilização.

No caso de extração de DNA a partir das amostras de pele, o protocolo de extração iniciou-se com uma pré-preparação da amostra, nomeadamente a maceração de um fragmento de pele com cerca de 2mg de peso. Depois de macerado o tecido, foi adicionado a um tubo estéril de 1,5ml com 150µl de tampão de lise e 3µl de Proteinase K. Após este passo a amostra foi a incubar a 65°C durante 15 minutos e posteriormente a 55°C durante 2h. Depois da incubação foram adicionados 50µl de solução precipitadora de proteínas e a amostra foi agitada no vórtex durante 20 segundos a amostra foi misturada sendo invertida cuidadosamente 50 vezes. Após a mistura da amostra, centrifugou-se durante 3 minutos a 20817g a +4°C, para se formar o precipitado de proteínas. Decantou-se o sobrenadante contendo o DNA para um tubo contendo 150µl de isopropanol a 100%. A amostra foi misturada sendo invertida cuidadosamente 50 vezes. Centrifugou-se durante 5 minutos. Após rejeição do sobrenadante, adicionou-se 150µl de etanol a 70% e procedeu-se à inversão suave da mistura num total de 20 vezes para lavar o precipitado de DNA. As amostras foram centrifugadas novamente durante 1 minuto a 20817g a +4°C. Após descartado o etanol com cuidado, o tubo foi invertido com a tampa aberta sob papel absorvente, deixando de seguida a secar ao ar durante 30

minutos. Por fim adicionou-se 30µl de hidratação. As amostras foram posteriormente incubadas a 65°C durante uma hora.

Por forma a verificar o sucesso dos procedimentos de extração efetuou-se, através de um espectrofotómetro *Nanodrop® 1000* (Thermo Scientific, EUA), a quantificação de ácidos nucleicos e a determinação do grau de pureza destes, com base na análise dos rácios 260/280 e 260/230. Após quantificação, o DNA foi guardado a -20°C até posterior utilização.

2. Diagnóstico serológico para deteção de anticorpos anti-*Leishmania*

2.1 Teste de imunofluorescência Indireta (IFI)

A IFI foi realizada segundo o método descrito por Abranches (1984). As lâminas de IFI foram preparadas no laboratório de Leishmanioses/IHMT usando como antigénio formas promastigotas da estirpe MHOM/PT/88/IMT151 de *Leishmania infantum* MON-1. Após a preparação das lâminas sensibilizadas, estas foram conservadas a -80°C.

Anteriormente à sua utilização, as lâminas foram colocadas à temperatura ambiente, sendo posteriormente mergulhadas em acetona por 10 minutos para fixação do antigénio. De seguida foram removidas da acetona e secas ao ar. Os soros a testar e os controlos negativos e positivos, com titulação previamente conhecida, foram diluídos (1:8) em progressão geométrica em PBS a pH7.2, aplicados a cada poço (25 µl) e incubados a +37°C em câmara húmida (Figura 9), durante 30 minutos. Após se retirar as lâminas da estufa, rejeitaram-se as gotas de soros diluídos por meio de jato de tampão, emergindo-se de seguida as lâminas no tampão de PBS durante 10 minutos, após os quais foram secas ao ventilador. Depois de secas, colocou-se 25 µl de conjugado (AntiCat IgG FITC, Sigma) diluído em solução azul de Evans (1:100000 de azul de Evans em PBS) em cada poço. Procedeu-se à lavagem e incubação em câmara húmida, durante meia hora, rejeitando o excesso de conjugado e colocou-se em PBS durante 10 minutos. Após montagem com glicerina tamponada (1:10) e lamela, procedeu-se à leitura em microscópio de fluorescência, com filtro ultravioleta (objetiva de 40X), no

comprimento de onda 475 nm, em que no caso de reação positiva os promastigotas mostram fluorescência verde. A ausência de anticorpos anti-*Leishmania* caracteriza-se por um campo ótico obscurecido, promastigotas pouco visíveis e/ou avermelhados. Como controlo positivo da reação, utilizou-se soro de gato com um título de 1024. Consideraram-se positivos os soros de gato que demonstraram fluorescência verde, uma vez que não existe um limiar de positividade definido.



Fig. 9 Preparação das amostras a serem testadas através da técnica serológica de IFI (foto do autor).

2.2 Teste de contraimunoelectroforese (CIE)

A CIE foi realizada segundo o método descrito por Campino (1998). O antígeno solúvel foi preparado no laboratório de Leishmanioses/IHMT usando as formas promastigotas da estirpe MHOM/PT/88/IMT151 de *Leishmania infantum* MON-1. Depois de identificar as tiras de acetato de celulose gelificado com o lápis, estas foram mergulhadas com os cantos cortados do lado do polo negativo e numa tina com tampão barbital sódico 0,08 M, pH 8,2 (16 gr barbital sódico, 1000ml de água destilada, HCL 1N). O soro a testar (15 µl) foi depositado nas tiras no lado do ânodo e 15 µl de antígeno (50 mg/ml) no lado do cátodo, distando 1,5 cm entre ambos. Procedeu-se à eletroforese em tampão, utilizando uma corrente de 75 V/cm, durante duas horas a

+4°C. Após lavagem com soro fisiológico a 0,9%, as tiras foram coradas numa solução de azul brilhante de Coomassie (5 gr de azul brilhante de Coomassie + 1000 ml de solução descorante, constituída por 500 ml de metanol p.a., 400 ml da água destilada e 100 ml de ácido acético glacial p.a.) durante 10 minutos, e posteriormente, colocadas na solução descorante, até ao aparecimento dos arcos de precipitação.

Consideraram-se positivos, todos os soros que revelaram, pelo menos, um arco de precipitação (Campino, 1998).

2.3 ELISA

A técnica de ELISA foi realizada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (LeisScan® LEISHMANIA ELISA TEST – Esteve, Portugal). Este ensaio imunoenzimático permite a deteção e medição semi-quantitativa de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de cão.

O procedimento iniciou-se com a adição de 100 µl de amostra e controlos previamente preparados, na diluição de 1:20 (10 µl de soro em 190 µl de solução de diluição fornecida pelo kit), incubando-se em seguida as amostras 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de 5 lavagens, com solução de lavagem fornecida pelo fabricante, adicionou-se 100 µl/poço de conjugado. Após incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente procedeu-se a 5 lavagens e à adição de 100 µl/poço de substrato e incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Por fim juntaram-se 100 µl/poço de solução de bloqueio fornecida com o kit e a absorvância foi lida a 450 nm em espectrofotómetro de microplacas. O resultado de cada amostra foi calculado segundo a fórmula fornecida pelo fabricante: Razão (Rz) da amostra = Densidade Ótica (D.O.) amostra/ D.O. controlo positivo baixo, sendo considerado o resultado positivo se a razão for superior a 1,1; duvidoso se a razão for entre 0,9 e 1,1 e negativo se inferior a este valor.

3. Amplificação de DNA de *Leishmania*

Neste trabalho, aplicaram-se dois protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA de *Leishmania*: (i) um protocolo de PCR convencional que envolveu um par de sequências iniciadoras ou “primers” desenhadas para reconhecer a sequência completa de DNA cinetoplastideal (kDNA) do minicírculo de *L. infantum*, específico para as espécies do complexo *L. donovani* (Cortes *et al.* 2004) e (ii) um protocolo de “Nested”-PCR, em que se efetuaram 2 reações de PCR, que envolveram “primers” direcionados para a região central do gene *SSU rRNA* do operão ribossomal, específico para o género *Leishmania*.

3.1 PCR

Para amplificação de kDNA do complexo *L. donovani* utilizaram-se os “primers” MC1: 5’GTTAGCCGATGGTGGTCTTG3’ e MC2: 5’CACCCATTTTCCGATTTTG-3’.

Preparou-se, para cada amostra (5 µl de DNA), 20 µl de uma mistura de reação constituída por 12,5 µl de *NZYTaq 2X Green Master Mix*® (Nzytech), 7,5 µl de água ultrapura e 1 µl de cada “primer” MC1 e MC2 [concentração de 5 pmol/µl, cada]. Em todas as amplificações utilizou-se como controlo positivo 3 µl de DNA genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultrapura em substituição do DNA. As misturas de reação foram posteriormente colocadas num termociclador *T100™ Thermal Cycler* (BioRad, Portugal), programado com as condições ótimas de amplificação (Tabela 1).

Tabela 1 Condições ótimas de amplificação com os “primers” MC1 e MC2.

Etapas	Temperatura (+°C)	Tempo
Desnaturação inicial	94	2 minutos
Desnaturação*	94	20 segundos
Ligação dos “primers”*	60	20 segundos
Extensão*	72	30 segundos
Extensão final	72	5 minutos
*Os três processos repetem-se por 30 ciclos		

Os produtos de amplificação (447pb) foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % (com tampão TAE 1x), corado com 3 µl de corante *GreenSafe Premium* (Nzytech, Portugal). Utilizou-se 5µl do marcador de 100pb *NZYDNA Ladder V®* (Nzytech) e os restantes poços foram carregados com 10µl de produto de PCR. Submeteu-se o gel a eletroforese a 120V durante 60 min e observou-se o resultado final no transiluminador de luz ultravioleta.

3.2 “Nested”-PCR

Para amplificação da região central do gene *SSU rRNA* do género *Leishmania* (Van Eys *et al.* 1992) através da técnica de “Nested”- PCR utilizaram-se dois grupos de “primers”; na primeira etapa de amplificação os “primers” R221 (5’GGTTCCTTTCCTGATTTACG3’) e R332 (5’GGCCGGTAAAGGCCGAATAG3’) e na segunda amplificação os “primers” R223 (5’TCCCATCGCAACCTCGGTT3’) e R333 (5’AAAGCGGGCGCGGTGCTG3’).

Na primeira etapa da técnica preparou-se por amostra (10 µl), 20 µl de uma mistura de reação constituída por 12,5 µl de *NZYTaq 2X Green Master Mix*, 5,5 µl de água ultrapura e 1 µl (concentração de 5 pmol) de cada “primer” (R221 e R332). Como controlo positivo utilizou-se 1 µl de DNA genómico de *L. infantum* de cultura e como controlo negativo água ultrapura em substituição do DNA. Para a segunda etapa, em tudo semelhante à primeira, utilizou-se 5 µl do produto da reação anterior (diluído a 1/200 em água ultrapura) em 20 µl da mistura acima descrita, permutando-se os “primers” (R223 e R333) e a temperatura de ligação.

Como controlo positivo utilizou-se o produto de PCR do controlo positivo da primeira amplificação também diluído e como controlo negativo, água ultrapura em substituição do DNA, assim como o produto de PCR do controlo negativo da primeira amplificação após diluição. Ambas as etapas foram consumadas no termociclador previamente programado com as condições ótimas de amplificação (Cruz *et al.* 2002) (tabela 2).

Tabela 2 Condições ótimas de amplificação com os “primers” R221 e R332 (em cima); e com os “primers” R223 e R333 (em baixo).

Nº de ciclos	Desnaturação	Ligação	Polimerização
1	5 minutos, 94°C	-	-
35	30 segundos, 94°C	30 segundos, 60°C	30 segundos, 72°C
1	-	-	10 minutos, 72°C

Nº de ciclos	Desnaturação	Ligação	Polimerização
1	5 minutos, 94°C	-	-
35	30 segundos, 94°C	30 segundos, 65°C	30 segundos, 72°C
1	-	-	10 minutos, 72°C

Os produtos de amplificação da segunda reação de PCR (358pb) foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % como descrito anteriormente.

É importante salientar que a extração de DNA, a preparação das misturas de reação, a amplificação de DNA, a diluição dos produtos de PCR a utilizar na segunda amplificação da técnica “Nested”-PCR e a eletroforese, foram realizadas em áreas

separadas, com material distinto e em tempos diferentes, de forma a evitar possíveis contaminações.

4. Análise de dados

O tamanho da amostra (n=60) foi calculado através da ferramenta informática OpenEpi versão 3.01 (disponível em <http://www.openepi.com>) tendo em conta a seroprevalência de leishmaniose canina (4,7%) obtida no distrito de Faro por Cortes *et al* (2012). A seleção dos animais não se baseou num método probabilístico, tendo resultado da facilidade de amostragem (conveniência; gatos capturados no âmbito do programa CER).

Foi construída uma base de dados (*Microsoft Office Excel* 2013) de modo a realizar um tratamento informatizado dos resultados dos testes de diagnóstico, referentes aos animais em estudo. Para a análise estatística utilizou-se o programa informático SPSS. Statistics 21.0 (IBM SPSS Modeler).

O teste estatístico utilizado foi o de Qui-quadrado (χ^2) ou de Fisher para analisar a associação entre variáveis, tendo-se assumido como nível de significância um valor de $p < 0,05$. A hipótese nula, neste estudo, foi a de que as variáveis em estudo são independentes; e como hipótese alternativa as variáveis em estudo serem dependentes.

Consideraram-se como expostos ou infetados pelo parasita os animais cujas amostras se revelaram positivas para pelo menos uma das técnicas utilizadas no estudo.

5. Resultados

5.1 Caracterização da amostra

A amostra corresponde a um total de 75 gatos provenientes do concelho de Faro. Quanto ao género, 48 (64%) gatos eram do sexo feminino e 24 (32%) do sexo masculino; em três (4%) gatos essa informação não se encontrava disponível (Figura 10).

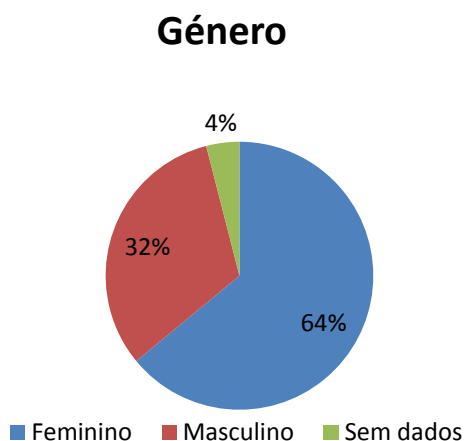


Fig. 10 Caracterização da amostra segundo o género (n=75).

No que diz respeito à idade, 22 (29,3%) gatos eram “Adultos” ($\geq 1 < 7$ anos). Não foram registados gatos nas categorias de “Júnior” (< 1 ano) ou “Sénior” (≥ 7 anos), e em 53 (70,6%) animais a idade era desconhecida.

A pelagem curta foi observada na maioria dos gatos (n= 65; 86,6%) tendo sido apenas observado um gato com pelagem média. Nove gatos não tinham qualquer informação do tipo de pelagem.

Dos 75 gatos, apenas 3 apresentavam sinais clínicos compatíveis com leishmaniose.

5.2 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por técnicas serológicas

A presença de anticorpos fluorescentes foi observada em dois (3,0%) dos 66 soros testados através da técnica de IFI, com títulos de 8 (amostra AL8) e 32 (amostra AL26). A técnica de CIE revelou a presença de anticorpos em duas (2,9%) das 68 amostras testadas (Figura 11).

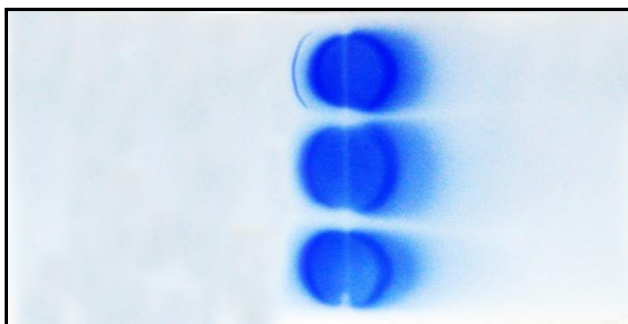


Fig. 11 Técnica de contraímuno-elektroforese. Formação de um arco de precipitação, correspondente à amostra AL26. (foto do autor).

Das 61 amostras de soro testadas através da técnica de ELISA, detetaram-se anticorpos específicos anti-parasita em três (4,9%;) com valores de 4,0 (positivo muito alto; razão da amostra entre 3 e 4); 2,3 (positivo alto; razão da amostra entre 2 e 3) e 1,2 (positivo baixo; razão da amostra entre 1,1 e 1,5). Em três amostras os resultados foram considerados duvidosos (razão da amostra entre 0,9 e 1,1, segundo as instruções do fabricante).

5.3 Detecção de DNA de *Leishmania*

O DNA de *L. infantum* foi amplificado em apenas 1 (1,4%) das 68 amostras de sangue periférico testado através da PCR convencional (Figura 12). Através da técnica de “Nested”- PCR (Figura 13) amplificou-se o DNA do parasita em 17 (25%) amostras.

A quantificação de ácidos nucleicos através de espectrofotometria revelou o insucesso de obtenção de DNA em 13 das 75 amostras de pele processadas. Todas as amostras de pele das quais se obteve DNA (n=62) foram negativas para a presença do parasita através das técnicas de PCR convencional e “Nested”-PCR.

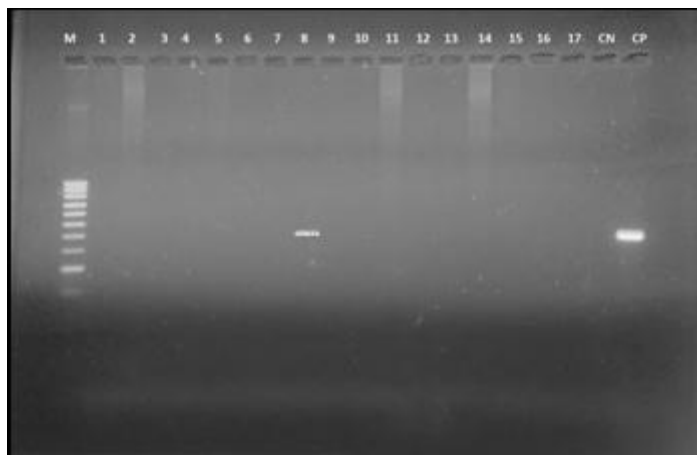


Fig. 12 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os resultados da amplificação de DNA de *L. infantum* com os “primers” MC1 e MC2: M: Marcador 100pb; Linha 8 amostra positiva; CN: controlo negativo; CP: controlo positivo.

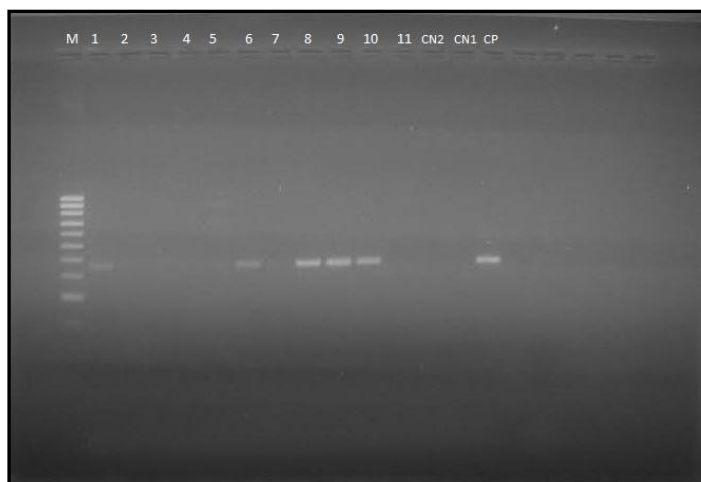


Fig. 13 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os resultados da amplificação de DNA de *Leishmania* spp. através da técnica de “Nested” –PCR. M: Marcador 100pb; Linhas 1, 6, 8, 9, 10 amostras positivas. CN2: controlo negativo da 2ª reação; CN1: controlo negativo da 1ª reação; CP: controlo positivo.

Caracterização dos gatos expostos/infetados por *Leishmania*

Tendo em conta que foram considerados como expostos ou infetados pelo parasita os animais cujas amostras se revelaram positivas para pelo menos uma das técnicas utilizadas no estudo (Tabela 3; ANEXO I), a prevalência da infeção por *Leishmania* obtida neste estudo foi de 29,3% (22/75).

Dos 22 gatos que foram positivos para pelo menos uma das técnicas, 15 (68,1%) eram do género feminino e 6 (27,2%) do género masculino (em apenas um gato não se obteve informação da género). Apenas uma das amostras (AL26) foi considerada positiva por quatro técnicas (IFI, CIE, ELISA e nPCR).

Tabela 3 Resumo dos resultados obtidos através das técnicas de diagnósticos utilizados no estudo.

	Testados	Positivos (n/%)
Métodos serológicos	68	4 (6,0%)
IFI	66	2 (3,0%)
CIE	68	2 (3,0%)
ELISA	61	3 (4,9%)
Métodos Moleculares	68	18 (26,4%)
cPCR Sangue	68	1 (1,4%)
nPCR Sangue	68	17 (25%)
cPCR Peles	62	0 (0%)
nPCR Peles	62	0 (0%)

Legenda: IFI- Imunofluorescência indireta; CIE- contraimunoelctroforese; ELISA “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay “, cPCR - PCR convencional; nPCR - “Nested”-PCR.

O único animal (AL23) com resultado positivo através da técnica de PCR convencional, era do género feminino, tinha a pelagem curta e não apresentava sinais clínicos. Dos 17 gatos onde se amplificou DNA do parasita no sangue periférico através da técnica de “Nested”-PCR, 11 eram fêmeas, 5 eram machos e um dos gatos não tinha o género na ficha de identificação. O gato (AL6) que não tinha a informação do género, tinha pelagem curta e apresentava lesões dérmicas (alopecia e/ou seborreia e/ou ulcerações). Um dos machos (AL36), também com pelagem curta, apresentava adenomagalia e uma ferida na pata e aparentava ter 1 ano de idade, estando na categoria de adulto. Nenhum dos outros animais com resultado positivo através da técnica de “Nested”-PCR positiva apresentava sinais clínicos.

Das duas amostras de soro onde se detetaram anticorpos do parasita através da técnica de IFI, uma pertencia a uma gata de pelagem curta e que não apresentava sinais clínicos. A outra amostra positiva pertencia a um gato de pelo curto (idade desconhecida) que não apresentava sinais clínicos; esta amostra foi também considerada positiva através das outras duas técnicas serológicas utilizadas no estudo, e o DNA do parasita foi detetado no sangue periférico através da técnica de “Nested”-PCR.

A outra amostra considerada como positiva através da técnica de CIE pertencia a um gato do género feminino, de pelagem curta enquanto as outras duas positivas por ELISA pertenciam a um gato (AL 42) e a uma gata (AL 69) que não apresentavam sinais clínicos compatíveis com a parasitose em estudo.

Não se verificou nenhuma associação significativa entre as variáveis género e sinais clínicos e a deteção de DNA do parasita ou a presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* ($p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 Avaliação das variáveis “género e sinais clínicos” e a deteção de DNA do parasita e/ou a presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania*.

Variável/categoria	Nº de gatos testados (%)	Nº de gatos positivos (% IC 95%)
Género	66	$\chi^2 = 1,010$; gl = 1; $p = 0,315$
Feminino	43 (65,2)	15 (34,8 21,0-50,9)
Masculino	23 (34,8)	6 (26,0 10,2-48,4)
Sinais clínicos	69	$p = 1,000$
Ausentes	66 (95,7)	20 (30,8 19,5-42,8)
Presentes	3 (4,43)	2 (33,3 0,9-99,1)
Total	75	22 (29,3 18,24-39,6)

6. Discussão

A Leishmaniose zoonótica causada pelo parasita *Leishmania infantum* é um grave problema de Medicina Veterinária e de Saúde Pública na bacia do Mediterrâneo e na América do Sul. A leishmaniose é endêmica em Portugal, tendo-se obtido num rastreio nacional realizado em 2009 uma seroprevalência global de leishmaniose canina de 6,3%, com prevalências superiores a 12% nos distritos de Castelo Branco, Beja e Portalegre e de 4,7% no distrito de Faro (Cortes *et al.* 2012). Apesar do cão ser considerado o principal hospedeiro e reservatório do parasita, nos últimos anos o número de casos de infeção por *L. infantum* e de leishmaniose nos gatos tem aumentado, questionando o papel destes animais na epidemiologia da doença (Pennisi *et al.* 2016; Maia & Campino, 2011). Estudos abrangendo Portugal continental mostraram prevalências de deteção de DNA de *Leishmania* de 0,3% em gatos do norte e centro (Vilhena *et al.* 2013) e de 9,9%, no sul (Maia *et al.* 2014). Para além da deteção do parasita e de anticorpos (Duarte *et al.* 2010; Pinto, 2013; Vaz *et al.* 2005) anti-*Leishmania* (Cardoso *et al.* 2010; Maia *et al.* 2008; 2010; 2015a; Vilhena *et al.* 2013), vários casos de leishmaniose felina têm sido relatados (Durão *et al.* 1994; Marcos *et al.* 2009; Sanches *et al.* 2011; Maia *et al.* 2015b; Pimenta *et al.* 2015; Basso *et al.* 2016). Como o papel dos gatos na epidemiologia das leishmanioses não está clarificado, o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência da infeção por *Leishmania* em gatos errantes da região do Algarve. Para tal, foi estudada uma amostra de 75 animais através de técnicas serológicas (CIE, ELISA, IFI) e de técnicas moleculares (PCR convencional e “Nested”-PCR).

Considerou-se como expostos/infetados por *Leishmania* os animais com pelo menos uma das técnicas positivas. A prevalência de infeção por *Leishmania* de 29,3% (22/75) obtida no presente estudo, foi superior à do trabalho realizado por Ramos (2012) de 4,6% em 217 gatos provenientes da mesma região; esta diferença poderá estar relacionada com: (i) a população em estudo; no presente trabalho apenas foram avaliados gatos errantes, os quais por norma não recebem cuidados médico-veterinários, encontram-se subnutridos, parasitados e uma vez que permanecerem no exterior, estão expostos a um maior contacto com o vetor; (ii) a oscilação da prevalência da infeção, a

qual varia ao longo dos anos, estando relacionada com a densidade flebotomínica e com o número de flebótomos infetados; (iii) o número de técnicas utilizadas (no presente estudo foram utilizadas cinco e no trabalho de Ramos apenas duas), assim como com a diferente sensibilidade e especificidade das mesmas na deteção de anticorpos e/ou do parasita.

A utilização da técnica de PCR para diagnóstico é fiável, relativamente rápida, reproduzível e muito mais sensível do que os métodos parasitológicos convencionais e serológicos (Paltrinieri *et al.* 2010). Embora os tecidos comumente utilizados para a pesquisa de *Leishmania* spp. em cães sejam aspirados de medula óssea, de gânglio linfático e pele, estas amostras biológicas são obtidas por técnicas invasivas, incompatíveis com a realização de estudos epidemiológicos onde um elevado número de amostras tem de ser processado (Maia, 2006; citado por Maia & Campino, 2008). Relativamente aos gatos, e devido à dificuldade de manuseamento dos mesmos, a obtenção de uma amostra de sangue periférico é a de mais fácil obtenção. Como tal, a colheita de sangue periférico no presente estudo, permitiu simultaneamente a obtenção de soro e de amostra para pesquisa do material genético do parasita, tendo-se detetado DNA de *Leishmania* utilizando a PCR convencional numa amostra de sangue (1,4%) e em 17 (25%) usando a técnica de “Nested”-PCR. As 16 amostras em que o DNA do parasita apenas foi detetado através da técnica de “Nested”-PCR pode ser explicado por esta apresentar uma maior sensibilidade devido à realização de dois processos de amplificação do material genético com dois pares de “primers” diferentes (Paltrinieri *et al.* 2010). Uma vez que as amostras foram colhidas durante a época de atividade flebotomínica (i.e. durante a época de transmissão do parasita) não se pode descartar que se trate de uma contaminação natural com o DNA do parasita ou de uma infeção transitória. De modo a obter um valor da prevalência da infeção mais próximo da realidade, o ideal seria testar este tipo de amostra fora da época de atividade dos vetores e/ou testar vários tecidos do mesmo animal (Chatzis *et al.* 2014). Como no âmbito do programa de esterilização, e de modo a identificar os animais já intervencionados, a ponta da orelha esquerda é cortada, foi possível avaliar a presença de *Leishmania* neste tecido; contudo não se detetou material genético do parasita em nenhuma das 62 amostras de pele, o que poderá estar relacionada com o facto da disseminação do parasita nos diferentes tecidos e órgãos ser heterogénea (Maia & Campino, 2008) ou

porque a disseminação para este tecido acontecer em estádios mais tardios da infecção (Travi *et al.* 2001).

De qualquer modo, a prevalência de infecção obtida através da técnica de “Nested”- PCR (25%) foi superior à obtida por Maia *et al.* (2014) em gatos errantes e domésticos do distrito de Faro, demonstrando a suscetibilidade desta espécie animal ao parasita.

Apenas dois dos animais em estudo dos quais se amplificou DNA do parasita a partir do sangue periférico apresentavam sinais clínicos compatíveis com leishmaniose (nomeadamente lesões cutâneas e linfadenomegalia) corroborando por um lado os resultados obtidos por outros autores de que estes são as manifestações clínicas mais comuns (Pennisi *et al.* 2015 e Soares *et al.* 2016), e por outro, que em regiões endêmicas a maioria dos animais parasitêmicos não desenvolvem sintomatologia (Maia *et al.* 2010 e Pennisi *et al.* (2012), o que de acordo com Chatzis *et al.* (2014) poderá ser explicado pela resistência natural dos gatos ao parasita ou ao desenvolvimento de doença.

Nos 16 animais em que apenas se detetou material genético do parasita no sangue periférico, pode ainda considerar-se a hipótese de se tratar de infecções recentes, em que ainda não tenha havido produção de anticorpos específicos, ou que estes não sejam detetáveis pelas técnicas utilizadas. A não produção ou o baixo nível de anticorpos poderá estar ainda relacionada com o fato da forma clínica mais comum em gatos ser a cutânea e não a visceral, evitando a disseminação sistêmica dos parasitas e a consequente produção de anticorpos (Solano-Gallego *et al.* 2007; Cardoso *et al.* 2010; Maia & Campino, 2011).

Neste trabalho detetaram-se anticorpos anti-*Leishmania* em 2 animais pela técnica de IFI (títulos 8, 32), em 2 por CIE e em 3 por ELISA.

A seroprevalência de 3,0% (2/66) obtida através da técnica de IFI foi superior à de Faria (2008) e Duarte (2010) de 0% e 0,6% obtidas em gatos errantes e inferior à de Garrido (2012) de 16,8% obtida em gatos errantes e domésticos. A diferença entre prevalências poderá estar relacionada com a diluição de soro usada como limiar de positividade. Tendo em conta a suposição de que a resposta imunitária humoral felina à

infecção por *Leishmania spp.* seja diferente da canina, nomeadamente que o título de anticorpos produzido pelos felinos seja muito reduzido (Maia & Campino, 2011b), optou-se por considerar positivos as amostras com um título >8 . De facto, e até ao momento não existe um limiar de positividade universalmente aceite para a técnica de IFI aplicada a soros felinos, evidenciando a necessidade de otimizar o valor de significância desta técnica de modo a permitir a comparação de resultados entre laboratórios. De acordo com Pennisi *et al.* (2012) o limiar de positividade para a infecção felina por *Leishmania spp.* deverá ser idêntica à utilizada em amostras caninas, nomeadamente ≥ 80 . Contudo até ao momento o limiar de positividade utilizado nos diversos estudos em Portugal tem variado entre 2 e 180 (Duarte *et al.* 2009; Maia *et al.* 2010).

Apesar de ser uma técnica qualitativa, a técnica de CIE é bastante útil no rastreio de casos em estudos epidemiológicos (Safi & Evans, 1989). Uma das vantagens da técnica é a precocidade em detetar soros com imunoglobulinas anti-*Leishmania*, contudo não permite distinguir entre a fase aguda e a fase remissiva da infecção, pelo que a deteção no presente estudo de anticorpos em dois animais através desta técnica não permite determinar se os animais apresentavam infecção ativa ou se os anticorpos eram residuais (Millesimo *et al.* 1996; Baleeiro *et al.* 2006).

Outra das técnicas serológicas utilizadas em estudos epidemiológicos é a ELISA, pela vantagem de analisar simultaneamente um elevado número de amostras. A deteção de anticorpos específicos contra o parasita em amostras felinas tem variado entre os 0,6% em gatos errantes e domésticos e os 13,2% em gatos errantes, utilizando antigénios produzidos em condições laboratoriais. Neste estudo foi utilizada uma ELISA comercial (LeisScan®) desenvolvida para o diagnóstico laboratorial de LCan sendo considerada por alguns autores como o teste mais adequado para detetar a infecção por *L. infantum* em cães (Rodríguez *et al.* 2013; Solano-Gallego *et al.* 2014). A deteção de anticorpos anti-parasita em 3 das amostras reforça o resultado obtido por Pinto (2013) em como este kit pode ser usado para a deteção da exposição/infecção por *Leishmania* em gatos.

É importante salientar que, para além dos animais considerados seropositivos não apresentarem sinais clínicos, os títulos de anticorpos específicos contra o parasita

detetados eram baixos, o que dependendo da sensibilidade da técnica poderá levar ao subdiagnóstico da infecção, tendo consequências ao nível epidemiológico, uma vez que estes animais poderão transmitir e disseminar o parasita aos vetores e, consequentemente, a outros hospedeiros vertebrados (Maia *et al.* 2008). Por outro lado, o fato dos resultados obtidos através das três técnicas serológicas apenas serem concordantes num animal reforça a necessidade de padronizar protocolos, estabelecer limiares de positividade e definir uma técnica “gold standard”, tal como já se encontra feito no caso da LCan (Miró *et al.* 2014).

As diferenças entre a prevalência obtida através de técnicas serológicas e moleculares em estudos epidemiológicos são de esperar, uma vez que a serologia reporta a exposição à infecção, através da deteção de anticorpos (Martín-Sánchez *et al.* 2006) e as técnicas moleculares avaliam a presença de infecção através da pesquisa de DNA parasitário. Na maioria dos estudos realizados até hoje, a sensibilidade da deteção do parasita foi muito superior através de PCR comparativamente à serologia (Martín-Sánchez *et al.* 2007; Ayllón *et al.* 2008; Maia *et al.* 2010). Nos gatos, o diagnóstico definitivo é normalmente conseguido através de métodos diretos como a citologia, cultura *in vitro* ou técnicas moleculares (Gramiccia, 2011).

De modo a relacionar os resultados serológicos e moleculares com as variáveis em estudo, fez-se a recolha de dados epidemiológicos aquando das colheitas, nomeadamente, género, idade, pelagem e a presença de sinais clínicos compatíveis com a parasitose em estudo. Contudo em alguns casos as fichas individuais não foram devidamente preenchidas, não tendo sido possível obter estes dados quer para todas as variáveis, quer para todos os animais.

Após análise estatística, verificou-se a inexistência de uma associação significativa entre os dados epidemiológicos analisados e a presença/exposição ao parasita, corroborando os resultados obtidos em estudos anteriores onde não foi encontrada uma relação entre a prevalência de infecção e o género (Solano-Gallego *et al.* 2007; Diaknou *et al.* 2009) ou a presença de sinais clínicos (Maia *et al.* 2010). Contudo, e apesar de não ser estatisticamente significativo, a maioria dos animais expostos/infetados eram do sexo feminino confirmando os resultados obtidos em gatos domésticos de Itália (Pennisi, 2002) e contrastando com os resultados obtidos em gatos domésticos do norte de Portugal (Cardoso *et al.* 2010). Por outro lado, este resultado

poderá ter sido influenciado pelo facto da amostra em estudo ser constituída maioritariamente por fêmeas (43/72).

Em suma, este estudo reforça a ideia de que os gatos entram frequentemente em contacto com o parasita e que a leishmaniose deve ser tida em consideração no diagnóstico diferencial de patologias felinas, principalmente em áreas endémicas, como é a região do Algarve.

7. Conclusão

A leishmaniose causada por *L. infantum*, é uma zoonose endêmica na bacia mediterrânea. O aumento do número de infecções e casos de doenças relatados nos últimos anos, juntamente com a prevalência de infecção por *Leishmania* obtida no presente estudo sugerem que os gatos possam atuar como reservatório secundário do parasita em vez de hospedeiro acidental.

Este estudo aponta também para a necessidade de alertar os médicos veterinários de incluir esta parasitose do diagnóstico diferencial de patologias felinas em gatos que residam ou que visitem zonas endêmicas. A falta de diagnóstico da infecção por *Leishmania* em gatos que residam em áreas endêmicas subestima o risco de transmissão do parasita para os flebótomos, podendo contribuir para a manutenção do seu ciclo biológico. O aumento da prevalência de infecção por *Leishmania* em gatos poderá também estar relacionado com o aumento da utilização de inseticidas/repelentes como medida preventiva contra a leishmaniose em cães, tornando assim os gatos uma das principais fontes sanguíneas do flebótomo (Pimenta *et al.* 2016). Tendo em conta a inexistência quer de vacinas contra a leishmaniose quer de inseticidas ou repelentes contra os flebótomos que possam ser aplicados na população felina, todos os produtos atualmente registados contra estes insetos são à base de piretróides, os quais são extremamente tóxicos para gatos (Basso *et al.* 2016). Seria importante o desenvolvimento de agentes profiláticos que protegessem os gatos quer contra a infecção por *Leishmania* spp. quer do contacto com os vetores.

Este estudo reforça assim a necessidade de se implementar medidas profiláticas contra esta zoonose, com a finalidade de proteger a saúde animal e pública.

Referências bibliográficas

1. Abranches P. (1984). O kala-azar da área metropolitana de Lisboa e da região de Alcácer-do-Sal. Estudos sobre reservatórios domésticos e silvático e sobre a população humana em risco de infecção. *Tese. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 226 pp.
2. Afonso, M.O. & Alves-Pires (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In G. Santos- Gomes & I.P. Fonseca, *Leishmaniose Canina*. (pp.27-40). Portugal: Chaves Ferreira - Publicações, S.A.
3. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Gradoni L, Sereno D (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*.
4. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004349.
5. Albuquerque, A., Campino, L., Cardoso, L., & Cortes, S. (2017). Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasites & Vectors*, 10 (1), 57.
6. Alexander, B., & Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and veterinary entomology*, 17 (1), 1-18.
7. Alten B, Maia C, Afonso MO, Campino L, Jiménez M, González E, Molina R, Bañuls AL, Prudhomme J, Vergnes B, Toty C, Cassan C, Rahola N, Thierry M, Sereno D, Bongiorno G, Bianchi R, Khoury C, Tsirigotakis N, Dokianakis E, Antoniou M, Christodoulou V, Mazeris A, Karakus M, Ozbel Y, Arserim SK,

- Erisoz Kasap O, Gunay F, Oguz G, Kaynas S, Tsertsvadze N, Tskhvaradze L, Giorgobiani E, Gramiccia M, Volf P, Gradoni L. (2016). Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10 (2), e0004458.
8. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57(3), 1-88.
9. Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 7 (5), e35671.
10. Alves, M. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães e gatos em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP. (2016). *Tese. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Ilha Solteira*, 109 pp.
11. Ashford, R. W., & Bettini, S. (1987). Ecology and epidemiology: old world. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1, 365-424.
12. Ayllon, T., Tesouro, M. A., Amusatogui, I., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F., & Sainz, Á. (2008). Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149 (1), 361-364.
13. Baptista, S., Afonso, M.O., Casimiro, E., Campino, L., Ready, R.P., Alves-Pires, C., (2007). Spatial distribution of *Leishmania* sand fly vectors in Portugal: risk areas, climate changes and impacts on tourism. International Conference on Climate Change Impacts on Tourism (CLITOP), 7-8 Setembro, Lisboa, Portugal. Abstract book.
14. Basso, M. A., Marques, C., Santos, M., Duarte, A., Pissarra, H., Carreira, L. M., & Pereira da Fonseca, I. (2016). Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 2 (1), 2055116916630002.

15. Bates, P., (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37 (10): 1097-1106.
16. Benassi, J. C., Benvenga, G. U., Ferreira, H. L., Pereira, V. F., Keid, L. B., Soares, R., & de Sousa Oliveira, T. M. F. (2017). Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Experimental Parasitology*, 177, 93-97.
17. Branco, S. I., (2011). Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de *Leishmania* sp. no concelho de Torres Novas, Portugal. *Tese. Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 194 pp.
18. Campillo M. & Vázquez F., (2002). Parasitosis sistémicas – Leishmanioses canina in McGraw Hill, *Parasitología Veterinaria* 3ª edição, capítulo 36, 652-665.
19. Campino L. (1998). Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. *Tese. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 192 pp.
20. Campino, L., & Abranches P. (2002). Leishmaniose cutânea: Uma doença rara em Portugal?. *Acta Médica Portuguesa* 15 (5), 387-390.
21. Campino, L., & Maia, C. (2010). Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23 (5), 859-64.
22. Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J. A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., & Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine & International Health*, 11 (11), 1708-1714.
23. Cardoso, L., Lopes, A. P., Sherry, K., Schallig, H., & Solano-Gallego, L. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174 (1), 37-42.

24. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Reviews Microbiology*, 5 (11) , 873-882.
25. Chatzis, M. K., Leontides, L., Athanasiou, L. V., Papadopoulos, E., Kasabalis, D., Mylonakis, M., & Saridomichelakis, M. N. (2014). Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Experimental Parasitology*, 147, 54-59.
26. Cortes, S., Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. (2009). *Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 192 pp.
27. Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., & Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* sl-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98 (1), 12-17.
28. Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189 (2-4), 189-196.
29. Costa-Durão, J. F., Rebelo, E., Peleteiro, M. C., Correia, J. J., & Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra). Nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89 (511), 140-4.
30. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J; Spanish HIV-*Leishmania* Study Group (2002). A “Nested”- PCR polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S185-S189.

31. Da Silva S, (2007) Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados, submetidos a um protocolo terapêutico em Clínica Veterinária de Belo Horizonte. *Tese de Mestrado. Instituto de Ciências biológicas da Universidade Federal Minas Gerais*, 32-132;
32. Daval, N., Marchal, C., Guillaumot, L., Hüe, T., Ravel, C., Keck, N., & Kasbari, M. (2016). First report of autochthonous non-vectorial canine leishmaniasis in New Caledonia, south-western Pacific: implications for new control measures and recommendations on importation of dogs. *Parasites & Vectors*, 9 (1), 108.
33. David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22 (6), 491-502.
34. David, J. R., Stamm, L. M., Bezerra, H. S., Souza, R. N., Killick-Kendrick, R., & Lima, J. W. O. (2001). Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (6), 839-847.
35. de Lima VM, Ikeda FA, Rossi CN, Feitosa MM, Vasconcelos RO, Nunes CM, Goto H. (2010). Diminished CD4⁺/CD25⁺ T cell and increased IFN- γ levels occur in dogs vaccinated with Leishmune® in an endemic area for visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135.3: 296-302.
36. de Souza Testasicca, M. C., dos Santos, M. S., Machado, L. M., Serufo, A. V., Doro, D., Avelar, D., & Gazzinelli, R. T. (2014). Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. *Veterinary Parasitology*, 204 (3), 169-176.
37. Dedet, J. P., Carme, B., Desbois, N., Bourdoiseau, G., Lachaud, L., & Pratlong, F. (2013). Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. *La Presse Médicale*, 42 (11), 1469-1481.
38. del Giudice, P., & Marty, P. (2003). Cat-associated zoonosis: don't forget rabies and leishmaniasis. *Archives of Internal Medicine*, 163 (10), 1238-1238.

39. Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27 (5), 305-318.
40. Dhiman RC, Yadav RS. Insecticide resistance in phlebotomine sandflies in Southeast Asia with emphasis on the Indian subcontinent. *Infectious Diseases of Poverty* 5.1 (2016): 106.
41. Direção-Geral da saúde. Doenças de Declaração Obrigatória, 2009/2012. Lisboa: DGS, 2014. (Vol. 1).
42. Duguid, J., Marmion, B. and Swain, R. (1982). Microbiologia Médica. 12th ed. *Bologna: Editoriale Grasso*.
43. El Safi, S. H., & David A. Evans. (1989). A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (3): 334-337.
44. El-On J. (2009) Current Status and Perspectives of the Immunotherapy of Leishmaniasis. *The Israel Medical Association journal*. 11 (10).
45. Faria, T. (2008). Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. 123 pp.
46. Fernandes, C. B., Junior, J. T. M., de Jesus, C., da Silva Souza, B. M. P., Larangeira, D. F., Fraga, D. B. M., & Barrouin-Melo, S. M. (2014). Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, 32 (11), 1287-1295.
47. Ferrer L. (2002), Leishmaniosis canina: actualización en diagnóstico y terapêutica. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias – X Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia*, supl.118,20-21;

48. Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., & Roura, X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 137 (3), 214-221.
49. Galvis-Ovallos, F., da Silva, M. D., da Silva Bispo, G. B., de Oliveira, A. G., Neto, J. R. G., dos Santos Malafronte, R., & Galati, E. A. B. (2017). Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite*, 24, 2.
50. Gao, C. H., Yang, Y. T., Shi, F., Wang, J. Y., Steverding, D., & Wang, X. (2015). Development of an immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis based on detection of a circulating antigen. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9 (6), e0003902.
51. Garrido, J. (2012). Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. 99 pp.
52. Gontijo, C., & Melo M. (2004). Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7 (3): 338-349.
53. González, U., Pinart, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Alvar, J., & Tweed, J. (2009). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2):CD004834
54. Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33 (10), 1027-1034.
55. Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181 (1), 23-30.

56. Hailu, A., Musa, A. M., Royce, C., & Wasunna, M. (2005). Visceral leishmaniasis: new health tools are needed. *PLoS Medicine*, 2 (7), e 211.
57. Halimi M, Cheghabaleki ZZ, Modrek MJ, Delavari M.. (2016). Temporal Dynamics of Phlebotomine Sand Flies Population in Response to Ambient Temperature Variation, Bam, Kerman Province of Iran. *Annals of Global Health*, 82 (5): 824-831
58. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. (1998) Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (7): 1989-1995.
59. Hernández R. S., Leishmaniosis canina, estrategias de un parásito para evadir las respuestas del hospedador. (2012). *Discurso de Ingreso en Real Academia de ciências Veterinarias de Andalucía Oriental como academico correspondiente*.
60. Hernández-Rivera, M. P., Ramírez-Ramírez, A., Chiñas-Pérez, A., Monroy-Ostria, A., Cancino-Díaz, M. E., & Hernández-Montes, O. (2016). *NRAMP1* polymorphisms like susceptibility marker in Mexican focus of cutaneous leishmaniasis. *BioMed Research International*, 7951285.
61. Hosein, S., Blake, D. P., & Solano-Gallego, L. (2017). Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*, 144 (1), 95-115.
62. Ikeda-Garcia, F. A., Lopes, R. S., Marques, F. J., de Lima, V. M. F., Morinishi, C. K., Bonello, F. L., & Feitosa, M. M. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, 143 (3), 254-259.
63. Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD, Molyneux DH. (1977). *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 196 (1122) : 105-115.

64. Killick-Kendrick, R., (2002) The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In Canine Leishmaniasis: moving towards a solution : 57. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 57-68.
65. Langoni, H., Richini-Pereira, V. B., Scremin, C., Troncarelli, M. Z., Camargo, J. B., Machado, J. G., & Lucheis, S. B. (2015). Detecção molecular de *Leishmania* spp. em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para leishmaniose em cães procedentes do Bairro da Conquista, São Manuel-SP, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, 22 (4), 580-590.
66. Laurenti, M. D. (2009). Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)*, 6 (67), 13-23.
67. Léger, N., & Depaquit, J. (2001). Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Revue Française des Laboratoires* 338, 41-48.
68. Leiva, M., Lloret, A., Peña, T., & Roura, X. (2005). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology*, 8 (1), 71-75.
69. Lopes, A. P., Oliveira, A. C., Granada, S., Rodrigues, F. T., Papadopoulos, E., Schallig, H., & Cardoso, L. (2017). Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in domestic cats from Luanda, Angola. *Veterinary Parasitology*, 239, 15-18.
70. Magalhães, L. F., Wilson, T. M., & Magalhães, A. A. (2014). Quadro clínico de cães com leishmaniose visceral e sua correlação com a sensibilidade do teste parasitológico. *Veterinária Notícias*, 18 (2), 67-72.
71. Maia C. & Cardoso L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*, 213: 2-11.
72. Maia C. & Campino L. (2011). A importância do gato doméstico (*Felis catus domesticus*) na epidemiologia da leishmaniose zoonótica. *Veterinary Medicine*, 13 (76): 46-49.

73. Maia C. & Campino L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4): 274-287.
74. Maia C. & Depaquit J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*: 23: 55.
75. Maia, C. & Campino L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?. *Trends in Parasitology*, 27(8): 341-344.
76. Maia C, Ramos C, Coimbra M, Bastos F, Martins A, Pinto P, Nunes M, Vieira ML, Cardoso L, Campino L. (2014). Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 7(1): 115.
77. Maia C, Dionísio L, Afonso MO, Neto L, Cristóvão JM, Campino L. (2013) *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 (4): 481-487.
78. Maia C, Ferreira A, Nunes M, Vieira ML, Campino L, Cardoso L. (2014). Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4): 409-414.
79. Maia C, Parreira R, Cristóvão JM, Freitas FB, Afonso MO, Campino L. (2015). Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8(1): 173.
80. Maia C, Ramos C, Coimbra M, Cardoso L, Campino L. (2015). Prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* in cats from southern Portugal. *Parasitology International*, 64(2): 154-156.
81. Maia C, Nunes M, Campino L. (2008). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4): 555-560.
82. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of

- public health concern. *Journal of Medical and Veterinary Entomology*. 27(2): 123–47.
83. Martins, S., Vilares, A., Ferreira, I., Reis, T., & Gargaté, M. J. (2014). Leishmaniose: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infecção entre 2008 e 2013. *Boletim Epidemiológico Observações*, 3, 23-25.
84. Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145 (3), 267-273.
85. Mauricio I, Campino L, Abranches P. (1995). Quality control of the micro-ELISA technic applied to the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Médica Portuguesa* 8.11 607-11.
86. McCown, M., & Grzeszak, B. (2010). Zoonotic and infectious disease surveillance in Central America: Honduran feral cats positive for toxoplasma, trypanosoma, leishmania, rickettsia, and Lyme disease. *Journal of Special Operations Medicine: A Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals*, 10 (3), 41-43.
87. McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2013). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, 107 (1), 7-14.
88. McMaster, W. R., Morrison, C. J., & Kobor, M. S. (2016). Epigenetics: A New Model for Intracellular Parasite–Host Cell Regulation. *Trends in Parasitology*, 32 (7), 515-521.
89. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2014). *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*– 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 120 pp.
90. Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis–new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24 (8), 371-377.

91. Miró, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., & Oliva, G. (2017). Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. *Trends in Parasitology*, 33, 718-730.
92. Neto, L.S., Sobrinho, L.S.V., Martins, C.O., Machado, R.Z., Marcondes, M. & Felix de Lima, V.M. (2011). Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Veterinary Parasitology*, 177 pp, 374–377.
93. Obwaller AG, Karakus M, Poepl W, Töz S, Özbel Y, Aspöck H, Walochnik J. (2016). Could *Phlebotomus mascittii* play a role as a natural vector for *Leishmania infantum*? New data. *Parasites & Vectors*, 9 (1) 458.
94. Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., & Zini, E. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236 (11), 1192-1198.
95. Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O. (2004). Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (6): 2769-2770.
96. Otranto D, Napoli E, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Greco G, Lorusso E, Gulotta L, Falsone L, Basano FS, Pennisi MG, Deuster K, Capelli G, Dantas-Torres F, Brianti E. (2017). Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. *Veterinary Parasitology*, 236: 144-151.
97. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E; Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236 (11): 1184-1191.

98. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Report Leishmaniasis N #4 –July 2016.
99. Pennisi MG, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Möstl K, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. (2013). Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15 (7) 638-642.
100. Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego L (2015). LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 8 (1): 302.
101. Pennisi, M. G., Lupo, T., Malara, D., Masucci, M., Migliazzo, A., & Lombardo, G. (2012). Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. *Journal Feline Med Surg*, 14 (656), 7.
102. T-Pereira-da-Silva, S., D-Ferreira-Vieira-Marques, L., Coelho-Lamounier, K. C., M-de-Castro, J., & Borja-Cabrera, G. P. (2017). Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. *Revista de bioética y derecho*, (39), 135-151.
103. Pimenta, P. F. P., Modi, G. B., Pereira, S. T., Shahabuddin, M., & Sacks, D. L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115 (4), 359-369.
104. Ramos, C. (2012). A importância da infecção por *Leishmania spp.* e *Dirofilaria immitis* em gatos na região de Olhão, *Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa*. 136 pp.
105. Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15 (10), 19505.
106. Ribeiro, A. (2014). Avaliação de duas técnicas serológicas (IFI e ELISA) e uma técnica molecular (qPCR em amostra de pele) no diagnóstico de infecção por

- Leishmania infantum* em cães. *Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária Universidade de Lisboa*. 115 pp.
107. Risueño, J., Muñoz, C., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., González, M., Ortuño, M., & Berriatua, E. (2017). Understanding *Phlebotomus perniciosus* abundance in south-east Spain: assessing the role of environmental and anthropic factors. *Parasites & Vectors*, 10 (1), 189.
108. Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 71 (3), 267-275.
109. Rodrigues ACM, Magalhães RD, Romcy KAM, Freitas JLS, Melo ACFL, Rodon FCM, Bevilacqua CML, Melo LM. (2017). A new whole mitochondrial genome qPCR (WMG-qPCR) with SYBR Green® to identify phlebotomine sand fly blood meals. *Veterinary Parasitology* 238: 17-23;
110. Rodriguez, J., *et al.* Evaluation of local immune response in feline leishmaniasis. Proceedings of the 27 WSAVA Congress: Oral Communications– (2002) *Infectious diseases, 3 a 6 October*;
111. Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3 (3), 251-262.
112. Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., Schaerer, V., Heier, A., Welle, M. M., & Roosje, P. J. (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *The Veterinary Record*, 156 (17), 542-545.
113. Sadlova, J., & P. Volf. Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology* 118 (5) (1999): 455-460.
114. Sadlova, J., Myskova, J., Lestinova, T., Votypka, J., Yeo, M., & Volf, P. (2017). *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote-and amastigote-initiated infections. *Parasitology*, 144 (4), 403-410.

115. Santos-Gomes, G. M., Campino, L., & Abranches, P. (2000). Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (2), 193-198.
116. Schallig, H. D., Cardoso, L., & Semião-Santos, S. J. (2013). Seroepidemiology of canine leishmaniosis in Évora (southern Portugal): 20-year trends. *Parasites & Vectors*, 6 (1), 100.
117. Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D., Presber, W., & Jaffe, C. L. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47 (1), 349-358.
118. Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal Vector Borne Disease*, 45 (4), 255-72.
119. Shimabukuro, P. H. F., & Galati, E. A. B. (2011). Lista de espécies de *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop*, 11 (1a), 1-20.
120. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 165 (1): 1-18.
121. Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., & Alberola, J. (2007). Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 147 (3), 315-319.
122. Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*, 7 (1), 111.

123. Spada, E., Proverbio, D., Migliazzo, A., Della Pepa, A., Perego, R., & Bagnagatti De Giorgi, G. (2013). Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* infection in stray cats in a nonendemic area in northern Italy. *ISRN Parasitology*, 2013.
124. Sunyoto, T., Potet, J., & Boelaert, M. (2017). Visceral leishmaniasis in Somalia: A review of epidemiology and access to care. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11 (3), e0005231.
125. Titus, R. G., & Ribeiro, J. M. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, 239 (4845), 1306-1308.
126. Tomás, A. & Romão, S. (2008). Biologia do parasita. Leishmaniose canina. Lisboa: Chaves Ferreira, 7-26.
127. Torres-Guerreiro E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. (2017). Leishmaniasis; a Review Research 6.
128. Travi, B. L., Tabares, C. J., Cadena, H., Ferro, C., & Osorio, Y. (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64 (3), 119-124.
129. van Eys Guillaume, J. J. M., Schoone, G. J., Kroon, N. C., & Ebeling, S. B. (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51 (1), 133-142.
130. Vaz, Y., Almeida, V., Pereira da Fonseca, I. M., Duarte, A., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J. A. F. S., & Fazendeiro, M. I. (2005). Estudo de doenças transmissíveis em populações de gatos errantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 33, 9-10.

131. Vilhena, H., Martinez-Díaz, V. L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., & Silvestre-Ferreira, A. C. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*, 6 (1), 99.
132. Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E., & Luciani, A. (2005). Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Veterinary Research Communications*, 29, 319-321.
133. World Health Organization (2010). Geographical distribution of cutaneous *leishmaniasis* in the world.
134. World Health Organization (2014). Leishmaniasis (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>). Geneva: (Fact sheet n°375) [consult. 2/6/2017].
135. Wulsten IF, Costa-Silva TA, Mesquita JT, Lima ML, Galuppo MK, Taniwaki NN, Borborema SET, Da Costa FB, Schmidt TJ, Tempone AG (2017). Investigation of the Anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* Activity of Some Natural Sesquiterpene Lactones. *Molecules* 22 (5): 685.
136. Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L. (2014). A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations. *Preventive Veterinary Medicine* 117 (1):7-18.
137. Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J. C., & Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *TRENDS in Parasitology*, 18 (6), 272-278.

ANEXOS

I. Resultados de todas as técnicas.

Amostra	Teste				
	PCR EDTA	“Nested”-PCR EDTA	IFI	ELISA	CIE
1	-	✓	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	✓	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	✓ 8	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	✓	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	Duvidoso	-
15	-	-	-	Duvidoso	-
16	-	✓	-	-	-
17	-	-	-	-	-
19 a	-	✓	-	-	-
19 b	-	✓	-	-	-
20	-	✓	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	✓	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
26	-	✓	✓ 32	✓	✓
27	-	✓	-	-	-
28	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-
31	-	✓	-	-	-
32	-	✓	-	-	-
33	-	✓	-	-	-

36	-	✓	-	-	-
38	-	-	-	Duvidoso	-
39	-	-	-	-	-
40	-	✓	-	-	
42	-	-	-	✓ baixo	-
43	-	-	-	-	-
44	-	-		-	-
45	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-
47	-	✓	-	-	-
48	-	-	-	-	-
49	-	✓	-	-	-
50	-	-	-	-	✓
51	-	-	-	-	-
52	-	✓	-	-	-
53	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-
63	-	-		-	-
65	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-
69	-	-	-	✓	-
70	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-

Legenda: ✓: detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* spp. no caso das técnicas serológicas e amplificação de DNA de *Leishmania* no caso das técnicas moleculares;
 – : ausência de detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* spp. através das técnicas serológicas e ausência amplificação de DNA de *Leishmania* spp. através das técnicas moleculares.

II. Ficha de identificação

Instituto de Higiene e Medicina Tropical Unidade de Parasitologia Médica Pesquisa de <i>Leishmania</i> em gatos			
Data da colheita: ____ / ____ / 2016			
Identificação do animal			
Nome: _____	Data nasc. (ou idade aprox.): _____		
Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>			
Raça: _____ Pelagem: Curta <input type="checkbox"/> Média <input type="checkbox"/> Comprida <input type="checkbox"/>			
Freguesia onde vive o animal: _____			
Concelho onde vive o animal: _____			
Se clinicamente suspeito, por favor indique os <u>sinais clínicos</u> presentes:			
Lesões dérmicas (alopécia e/ou seborreia e/ou ulcerações) <input type="checkbox"/>			
Linfadenopatia <input type="checkbox"/> Perda de peso progressivo <input type="checkbox"/> Atrofia muscular <input type="checkbox"/> Diminuição do apetite <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Letargia <input type="checkbox"/>	Lesões oculares <input type="checkbox"/> Epistáxis <input type="checkbox"/> Claudicação <input type="checkbox"/> Palidez das mucosas <input type="checkbox"/> Poliúria e Polidipsia <input type="checkbox"/> Vômito e/ou Diarreia <input type="checkbox"/>		
Doenças concomitantes:			
Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Qual? _____			
Material biológico:			
Sangue em tubo seco <input type="checkbox"/>			
Sangue em tubo c/ EDTA <input type="checkbox"/>			
Outro _____			
Colheita efectuada por: _____			

